



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

## CAMPUS PUEBLA

POSTGRADO EN ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

### **ESPECIES NOVEDOSAS DE CHAMPIÑONES (*Agaricus*) CON PROPIEDADES FUNCIONALES ANTIOXIDANTES Y ANTIMICROBIANAS, AISLADAS DE ZONAS RURALES DE MÉXICO**

**ELIZABETH CRUZ ROMERO**

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

PUEBLA, PUEBLA

2012



## COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPECHE-CÓRDOBA-MONTECILLO-PUEBLA-SAN LUIS POTOSÍ-TABASCO-VERACRUZ

CAMPUE- 43-2-03

### CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, la que suscribe **Elizabeth Cruz Romero**, alumna de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta Institución, bajo la dirección de la Profesora **Dra. Mercedes Sobal Cruz**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **Especies novedosas de champiñones (*Agaricus*) con propiedades funcionales antioxidantes y antimicrobianas, aisladas de zonas rurales de México** y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, la Consejera y la que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Puebla, Puebla, a 12 de enero del 2012

Elizabeth Cruz Romero

Vo. Bo. Profesora Consejera  
Dra. Mercedes Sobal Cruz

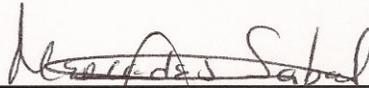
La presente tesis, titulada: **Especies novedosas de champiñones (*Agaricus*) con propiedades funcionales antioxidantes y antimicrobianas, aisladas de zonas rurales de México**, realizada por la alumna: **Elizabeth Cruz Romero**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO AGRÍCOLA REGIONAL

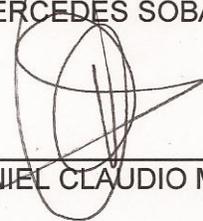
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA:



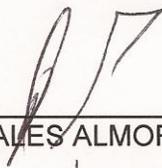
\_\_\_\_\_  
DRA. MERCEDES SOBAL CRUZ

ASESOR:



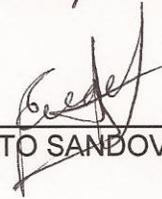
\_\_\_\_\_  
DR. DANIEL CLAUDIO MARTÍNEZ CARRERA

ASESOR:



\_\_\_\_\_  
DR. PORFIRIO MORALES ALMORA

ASESOR:



\_\_\_\_\_  
DR. ENGELBERTO SANDOVAL CASTRO

Puebla, Puebla, México, 23 de enero del 2012

# ESPECIES NOVEDOSAS DE CHAMPIÑONES (*Agaricus*) CON PROPIEDADES FUNCIONALES ANTIOXIDANTES Y ANTIMICROBIANAS, AISLADAS DE ZONAS RURALES DE MÉXICO

Elizabeth Cruz Romero, M. C.  
Colegio de Postgraduados, 2012

México cuenta con una gran diversidad biológica, sin embargo, poco se han aprovechado los recursos genéticos nativos para la producción comercial de hongos comestibles. Los champiñones, son los hongos comestibles más comercializados en el mercado mexicano para lo cual se usan cepas extranjeras. La presente investigación se inició con el estudio preliminar de 15 cepas nativas de México de *Agaricus* spp. Dado que la investigación requería de biomasa micelial, al final solo se trabajó con dos cepas de *Agaricus* spp. (CP-83 y CP-89). Al micelio de estas cepas se les determinaron antioxidantes y pruebas antimicrobianas. Estas pruebas se realizaron de macerados y extractos acuosos y etanólico. La prueba antimicrobiana se realizó con una cepa de *E. coli* (CPB-8). En el macerado de agua (M1) y extracto de agua resuspendido en agua (A1) de la cepa CP-83 se obtuvo un 95% de inhibición de crecimiento bacteriano. Mientras que en el extracto etanólico resuspendido en agua (E4), extracto etanólico resuspendido en alcohol (E6) y en el extracto acuoso resuspendido en agua (A1) de la CP-89 se observó una inhibición del 95 %. En el caso de contenido de fenoles totales, el mayor contenido se obtuvo en la CP-83 en el extracto acuoso resuspendido en alcohol 80:20 (A3) con 583.2 mg AG/g de muestra, mientras que en la CP-89 en el macerado de agua (M1) mostró la mayor cantidad con 1309.2 mg AG/g de muestra. Por otro lado, deben desarrollarse investigaciones más amplias para extraer e identificar químicamente los compuestos involucrados. De esta manera, los productores podrán proponer a los mercados alimentos con mayor valor agregado (antioxidantes y antimicrobianos), a través de estrategias adecuadas de transferencia de tecnología.

Palabras claves: *Agaricus*, micelio, cultivo de hongos comestibles, antioxidantes, antimicrobianos, *E. coli*.

**NOVEL SPECIES OF WHITE BUTTON MUSHROOMS (*Agaricus*) WITH  
ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT FUNCTIONAL PROPERTIES ISOLATED  
FROM RURAL AREAS OF MEXICO**

Elizabeth Cruz Romero, M. C.  
Colegio de Postgraduados, 2012

In spite of his rich biodiversity, Mexico has not taken advantage of his native genetic resources for commercial production of edible mushrooms. The white button mushroom is the most traded in the Mexican market using foreign strains. The present investigation began with the preliminary study of 15 native strains of *Agaricus* spp. Because the research required certain amount of mycelial biomass, at the end we work only with two strains (CP-83 and CP-89). The mycelium of these strains was used for antioxidant and antimicrobial test. The tests were performed with macerated and aqueous and ethanol extracts. The antimicrobial test was performed with a strain of *E. coli* (CPB-8). With the use of the aqueous macerated (M1) and aqueous extract resuspended in water (A1) of strain CP-83 was obtained a 95% inhibition of bacterial growth. While in the ethanol extract resuspended in water (E4), resuspended in ethanol extract alcohol (E6) and resuspended in water aqueous extract (A1) of the CP-89 was also observed an inhibition bacterial growth of 95%. In the case of total phenolic content, the highest content was obtained with the strain CP-83 in the extract resuspended in alcohol 80:20 (A3) with 583.2 mg GA/g sample, while the CP-89 in the aqueous macerated (M1) showed the highest amount with 1309.2 mg GA/g sample. Further research should be done to extract and identify the chemical compounds involved. Thus, the mushroom producers may propose to the market high value added food (antioxidants and antimicrobials), through appropriate strategies for technology transfer.

Keywords: *Agaricus* mycelia, cultivation of edible mushrooms, antioxidants, antimicrobials, *E. coli*.

## DEDICATORIAS

Con cariño

A Dios:

Por permitirme lograr un sueño más y nunca abandonarme en los momentos más difíciles.

A la memoria de mi padre y abuelita:

Sr. José Luis Octaviano Cruz Pérez  
Quien desde el cielo me protege hace ya 21 años, y los cuales me ha acompañado en cada etapa de mi vida.

Sra. Rufina Tercero Escalona  
Mujer incansable, quien hasta al final de su vida me enseñó a luchar contra la adversidad y que la felicidad está en lo que uno es.

A mi mamá:

Sra. Elisa Romero Tercero  
A quien le debo reconocer su actitud positiva en los momentos difíciles y por ser la persona que más me quiere.

A mi hermana:

Ma. Luisa Cruz Romero  
Con quien he compartido toda una vida de increíbles discusiones, pero de gran cariño.

A Enrique Sandoval Ramírez:

Quien es como un padre para mí, y uno de mis mejores amigos.

A mi esposo:

Oscar Marcelo Zarco  
Con quien apenas comienzo una vida, y con quien comparto el amor por los hongos.

## AGRADECIMIENTOS

A CONACYT, por el apoyo económico brindado para poder realizar mis estudios.

Al Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla por haberme aceptado en el Postgrado en Estrategias para el Desarrollo Agrícola Regional, para realizar la Maestría en Ciencias.

A la Dra. Mercedes Sobal Cruz, por haberme brindado la oportunidad de realizar la presente investigación, y al mismo tiempo darle las gracias por ser mi guía y su valiosa enseñanza académica y personal.

Al Dr. Daniel Claudio Martínez Carrera, por sus excelentes comentarios durante el proceso de formación.

Al Dr. Porfirio Morales Almora, por compartir su conocimiento y, por su valiosa y oportuna observación al presente trabajo.

Al Dr. Engelberto Sandoval Castro, por aceptar ser mi asesor.

Al Dr. Leopoldo López Martínez de Alva, por su valiosa asesoría. Lamentando que su delicado estado de salud no le permitiera seguir participando hasta el final de este trabajo de investigación.

Y a todos mis amigos y compañeros del Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales que me apoyaron en algún momento, en el desarrollo de mi trabajo de investigación y por brindarme su valiosa amistad, en especial a la M.C. Myrna Bonilla Quintero, Biol. Wilfrido Martínez Sánchez y Alma Graciela Tovar Rodríguez.

## CONTENIDO

	Página
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	3
2.1 Importancia de los hongos	3
2.2 Los hongos y su diversidad biológica	4
2.3 Hongos comestibles y medicinales	5
2.4 El cultivo de hongos	7
2.5 La comercialización de los hongos silvestres	7
2.6 Importancia de las propiedades funcionales de los hongos	8
2.7 Género <i>Agaricus</i>	9
2.8 Importancia del champiñón	10
2.9 Valor nutritivo	12
2.10 Estado actual del champiñón en México	13
2.11 Ciclo biológico del champiñón ( <i>Agaricus</i> )	13
2.12 Fisiología	15
2.13 Propiedades funcionales y antimicrobianas del champiñón	16
<b>III. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN</b>	17
<b>IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	18
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	19
5.1 Material biológico	20
5.2 Preparación del medio de cultivo CYM líquido	20
5.3 Producción de biomasa	21
5.4 Aislamiento del ADN, amplificación del ITS y secuenciación	22
5.5 Preparación de los extractos miceliales	23
5.6 Preparación de la prueba antimicrobiana utilizando la cepa CPB-8 de <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	26
5.6.1 Determinación de las propiedades antimicrobianas de las cepas de <i>Agaricus</i> spp (CP-83, CP-89)	27
5.7 Determinación de las propiedades antioxidantes	31
5.7.1 Curva de calibración estándar de ácido gálico	31
5.7.2 Determinación de los antioxidantes de las cepas de <i>Agaricus</i> spp. (CP-83 y CP-89) por el método de Müller	32
<b>VI. RESULTADO Y DISCUSION</b>	34
6.1 Determinación de la especie	34
6.2 Biomasa producida con agitación (120 rpm) y sin agitación	36
6.3 Cinética de crecimiento de la bacteria CPB-8 ( <i>E. coli</i> )	37
6.4 Pruebas antimicrobianas	38
6.4.1 Cepa CP-83 de <i>Agaricus</i> spp.	38
6.4.2 Cepa CP-89 de <i>Agaricus</i> spp.	46
6.4.3 Comparación del efecto antimicrobiano de las cepas en estudio sobre <i>E. coli</i>	54
6.4.4 Concentración mínima inhibitoria de los extractos miceliales	56
6.5 Determinación de antioxidantes	56

6.5.1	Cepa CP-83 de <i>Agaricus</i> spp.	56
6.5.2	Cepa CP-89 de <i>Agaricus</i> spp.	59
6.5.3	Comparación de las propiedades antioxidantes de las cepas en estudio	62
<b>VII. CONCLUSIONES</b>		66
<b>VIII. RECOMENDACIONES</b>		67
8.1	Recomendaciones generales	67
<b>IX. ESTRATEGIA PROPUESTA PARA EL APROVECHAMIENTO Y USO DE LOS RECURSOS GENÉTICOS DE LAS CEPAS DE <i>Agaricus</i> spp.</b>		68
9.1	Definición de estrategia	68
9.2	Diseño del paquete tecnológico del cultivo de <i>Agaricus</i> spp.	70
9.3	Aplicación del método estratégico	73
9.4	Actores de la estrategia	74
9.4.1	Centro de investigación Colegio de Postgraduados	74
9.4.2	Sector público	74
9.4.3	Mercado	75
9.4.4	Consumo	75
<b>X. BIBLIOGRAFÍA</b>		76
<b>XI. ANEXOS</b>		80
Anexo 1		80
Anexo 2		81
Anexo 3		85
Anexo 4		87
Anexo 5		88
Anexo 6		89
Anexo 7		91
Anexo 8		92

## LISTA DE CUADROS

		<b>Página</b>
<b>Cuadro 1</b>	Comparación nutricional del champiñón (%) en base al peso fresco.	12
<b>Cuadro 2</b>	Cepas de <i>Agaricus</i> utilizadas durante la investigación.	20
<b>Cuadro 3</b>	Clave de los extractos y análisis realizados en las cepas de <i>Agaricus</i> spp. cultivadas en medio de cultivo CYM líquido a 120 rpm.	24
<b>Cuadro 4</b>	Concentración de ácido gálico (ppm) utilizadas para la determinación de la curva de calibración de los antioxidantes.	32
<b>Cuadro 5</b>	Cantidad de biomasa seca obtenida de las cepas de <i>Agaricus</i> spp. CP-83 y CP-89 en 100 mL de medio de cultivo a los 28 días de incubación (n= 5).	36
<b>Cuadro 6</b>	Lecturas obtenidas al tiempo cero ( $t_0$ ) de la bacteria de <i>E. coli</i> (CPB-8), usada para medir el efecto antimicrobiano de los macerados obtenidos del micelio de la CP-83 de <i>Agaricus</i> spp.	38
<b>Cuadro 7</b>	Lecturas obtenidas a las 24 hrs ( $t_{24}$ ) después de inocular la bacteria <i>E. coli</i> (CPB-8), con el lector de microplacas EPOCH (Botek, USA) usada para medir el efecto antimicrobiano de los macerados realizados a partir del micelio de la CP-83 de <i>Agaricus</i> spp.	40
<b>Cuadro 8</b>	Lecturas obtenidas al tiempo cero ( $t_0$ ) de la bacteria de <i>E. coli</i> (CPB-8), usada para medir el efecto antimicrobiano de los extractos acuosos realizados a partir del micelio de la CP-83 de <i>Agaricus</i> spp.	41
<b>Cuadro 9</b>	Lecturas obtenidas a las 24 hrs ( $t_{24}$ ) de la bacteria de <i>E. coli</i> (CPB-8), usada para medir el efecto antimicrobiano de los extractos acuosos realizados a partir del micelio de la CP-83 de <i>Agaricus</i> spp.	42
<b>Cuadro 10</b>	Lecturas obtenidas al tiempo cero ( $t_0$ ) de la bacteria de <i>E. coli</i> (CPB-8), usada para medir el efecto antimicrobiano de los extractos etanólicos realizados a partir del micelio de la CP-83 de <i>Agaricus</i> spp.	44
<b>Cuadro 11</b>	Lecturas obtenidas a las 24 hrs ( $t_{24}$ ) de la bacteria de <i>E. coli</i> (CPB-8), usada para medir el efecto antimicrobiano de los extractos etanólicos realizados a partir del micelio de la CP-83 de <i>Agaricus</i> spp.	45
<b>Cuadro 12</b>	Lecturas obtenidas al tiempo cero ( $t_0$ ) de la bacteria de <i>E. coli</i> (CPB-8), usada para medir el efecto antimicrobiano de los macerados obtenidos del micelio de la CP-89 de <i>Agaricus</i> spp.	46
<b>Cuadro 13</b>	Lecturas obtenidas a las 24 hrs ( $t_{24}$ ) de la bacteria de <i>E. coli</i> (CPB-8), usada para medir las propiedades antimicrobianas de los macerados realizados a partir del micelio de la CP-89 de <i>Agaricus</i> spp.	48
<b>Cuadro 14</b>	Lecturas obtenidas al tiempo cero ( $t_0$ ) de la bacteria de <i>E. coli</i> (CPB-8), usada para medir el efecto antimicrobiano de los extractos acuosos realizados a partir del micelio de la CP-89 de <i>Agaricus</i> spp.	49
<b>Cuadro 15</b>	Lecturas obtenidas a las 24 hrs ( $t_{24}$ ) de la bacteria de <i>E. coli</i> (CPB-8), usada para medir el efecto antimicrobiano de los extractos	50

	acuoso realizado a partir del micelio de la CP-89 de <i>Agaricus</i> spp.	
<b>Cuadro 16</b>	Lecturas obtenidas al tiempo cero ( $t_0$ ) de la bacteria de <i>E. coli</i> (CPB-8), usada para medir el efecto antimicrobiano de los extractos etanólicos realizados a partir del micelio de la CP-89 de <i>Agaricus</i> spp.	52
<b>Cuadro 17</b>	Lecturas obtenidas a las 24 hrs ( $t_{24}$ ) de la bacteria de <i>E. coli</i> (CPB-8), usada para medir el efecto antimicrobiano de los extractos etanólicos realizados a partir del micelio de la CP-89 de <i>Agaricus</i> spp.	53
<b>Cuadro 18</b>	Caracterización a microscopio de la CP-43 ( <i>Agaricus bitorquis</i> ) en medio de cultivo CYM sólido con la variable de pH (5, 6 y 7).	82
<b>Cuadro 19</b>	Características de las cepas de <i>Agaricus</i> en medio de cultivo CYM sólido inoculada por homogenización.	82
<b>Cuadro 20</b>	Características de la CP-500 de <i>Agaricus</i> spp. en medio de cultivo CYM sólido inoculada por homogenización.	83
<b>Cuadro 21</b>	Características de crecimiento micelial en medio de cultivo CYM sólido inoculadas por homogenización de las cepas CP-501, CP-502, CP-503, CP-505, CP-560 de <i>Agaricus</i> spp.	83
<b>Cuadro 22</b>	Velocidad de crecimiento a los 15 días después de la inoculación de diferentes cepas de <i>Agaricus</i> spp.	84
<b>Cuadro 23</b>	Velocidad de crecimiento de la CP-43 ( <i>Agaricus bitorquis</i> ) y CP-500 ( <i>Agaricus</i> spp.) en medio de cultivo CYM sólido a los 29 días de incubación.	85
<b>Cuadro 24</b>	Características de la CP-500 de <i>Agaricus</i> spp. en medio de cultivo CYM sólido inoculada por homogenización.	86
<b>Cuadro 25</b>	Colonización y características de las cepas CP-43 y CP-57 ( <i>Agaricus</i> ) en masters sin cal: yeso al mes de incubación.	88
<b>Cuadro 26</b>	Colonización y características del micelio de los masters de las cepas de <i>Agaricus</i> spp. en relación a la proporción de cal: yeso a los 27 días de incubación.	90

## LISTA DE FIGURAS

		<b>Página</b>
<b>Figura 1</b>	Ciclo biológico de <i>Agaricus bisporus</i> (Tomado de Van Grienseven, 1988).	14
<b>Figura 2</b>	Proceso de producción del hongo <i>Agaricus bisporus</i> (Tomado de Martínez-Carrera, 2000).	15
<b>Figura 3</b>	Diagrama de flujo del trabajo realizado para determinar las propiedades funcionales antioxidantes y antimicrobianas de cepas nativas de <i>Agaricus</i> spp.	19
<b>Figura 4</b>	Diagrama general de la obtención de los extractos para la determinación de las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de las cepas de <i>Agaricus</i> .	23
<b>Figura 5</b>	Método de lectura de la cinética bacteriana contada en la cámara de Neubauer.	26
<b>Figura 6</b>	Forma en la que se realizó la cinética de crecimiento de <i>Escherichia coli</i> (CPB-8) utilizada en la prueba antimicrobiana.	27
<b>Figura 7</b>	Método de colocación en la microplaca de las muestras para la prueba de determinación antimicrobiana de los extractos de las cepas de <i>Agaricus</i> . <b>A</b> : distribución de medio cultivo líquido Muller Hinton y bacteria. <b>B</b> : distribución del extracto.	29
<b>Figura 8</b>	Forma en que se realizó el método de microdilución de acuerdo a Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para calcular la concentración mínima inhibitoria (CMI).	30
<b>Figura 9</b>	Colocación de las muestras en la microplaca para obtener la curva de calibración para determinar los antioxidantes en las cepas de <i>Agaricus</i> spp.	32
<b>Figura 10</b>	Método de colocación de las muestras en la microplaca para realizar la lectura de antioxidantes para cada uno de los extractos de las cepas de <i>Agaricus</i> spp.	33
<b>Figura 11</b>	Dendrograma de los recursos genéticos nativos de <i>Agaricus</i> que se recolectaron en diferentes regiones geográficas de México. Se deriva de una matriz generada en el programa MEGA4, por el método Neighbor-Joining (Tamura <i>et al.</i> , 2007), empleando secuencias de la región ITS-ADN y <i>Chlorophyllum</i> como grupo externo. Los grupos evolutivos y sus especies corresponden a aquellos reconocidos por GemL <i>et al.</i> (2004). El código de las cepas equivale a la clave del CREGENHC, COLPOS, Campus Puebla, ó al número de acceso en el European Bioinformatic Institute, Inglaterra (EBI). Todas las secuencias del ADN están registradas en la base sólida de datos del CREGENHC (Morales <i>et al.</i> , 2010). Cepas indicadas con una flecha sólida fueron las utilizadas en el presente estudio.	35
<b>Figura 12</b>	Crecimiento micelial de las cepas de <i>Agaricus</i> spp. (CP-83 y CP-89) incubadas durante 28 días a temperatura ambiente con agitación a 120 rpm.	36
<b>Figura 13</b>	Crecimiento micelial de las cepas de <i>Agaricus</i> spp. (CP-83 y CP- 89) sin agitación a los 28 días de crecimiento.	37
<b>Figura 14</b>	Cinética de crecimiento de la bacteria <i>Escherichia coli</i> (CPB-8) utilizada para evaluar las propiedades antimicrobianas de los extractos de <i>Agaricus</i> spp.	37

<b>Figura 15</b>	Lecturas obtenidas a tiempo cero ( $t_0$ ), con el lector de microplacas EPOCH (Biotek, USA) para la determinación del efecto antimicrobiano de los macerados (M1 y M2) obtenidos del micelio de la CP-83 de <i>Agaricus</i> spp. contra la bacteria de <i>E. coli</i> (CPB-8).	39
<b>Figura 16</b>	Lecturas obtenidas a las 24 hrs ( $t_{24}$ ), con el lector de microplacas EPOCH (Biotek, USA) para la determinación del efecto antimicrobiano de los macerados obtenidos del micelio de la CP-83 de <i>Agaricus</i> spp. contra la bacteria de <i>E. coli</i> (CPB-8).	40
<b>Figura 17</b>	Lecturas obtenidas al tiempo cero ( $t_0$ ), con el lector de microplacas EPOCH (Biotek, USA) para la determinación del efecto antimicrobiano en los extractos acuosos obtenidos del micelio de la CP-83 de <i>Agaricus</i> spp. contra la bacteria de <i>E. coli</i> (CPB-8).	42
<b>Figura 18</b>	Lecturas obtenidas a las 24 hrs ( $t_{24}$ ), con el lector de microplacas EPOCH (Biotek, USA) para la determinación del efecto antimicrobiano en los extractos acuosos obtenidos del micelio de la CP-83 de <i>Agaricus</i> spp. contra la bacteria de <i>E. coli</i> (CPB-8).	43
<b>Figura 19</b>	Lecturas obtenidas al tiempo cero ( $t_0$ ), con el lector de microplacas EPOCH (Biotek, USA) para la determinación del efecto antimicrobiano en los extractos etanólicos obtenidos del micelio de la CP-83 de <i>Agaricus</i> spp. contra la bacteria de <i>E. coli</i> (CPB-8).	44
<b>Figura 20</b>	Lecturas obtenidas a las 24 hrs ( $t_{24}$ ), con el lector de microplacas EPOCH (Biotek, USA) para la determinación del efecto antimicrobiano en los extractos etanólicos obtenidos del micelio de la CP-83 de <i>Agaricus</i> spp. contra la bacteria de <i>E. coli</i> (CPB-8).	46
<b>Figura 21</b>	Lecturas obtenidas a tiempo cero ( $t_0$ ), con el lector de microplacas EPOCH (Biotek, USA) para la determinación del efecto antimicrobiano de los macerados (M1 y M2) obtenidos del micelio de la CP-89 de <i>Agaricus</i> spp. contra la bacteria de <i>E. coli</i> (CPB-8).	47
<b>Figura 22</b>	Lecturas obtenidas al tiempo a las 24 hrs ( $t_{24}$ ), con el lector de microplacas EPOCH (Biotek, USA) para la determinación del efecto antimicrobiano en los extractos acuosos obtenidos del micelio de la CP-89 de <i>Agaricus</i> spp. contra la bacteria de <i>E. coli</i> (CPB-8).	48
<b>Figura 23</b>	Lecturas obtenidas al tiempo cero ( $t_0$ ), con el lector de microplacas EPOCH (Biotek, USA) para la determinación del efecto antimicrobiano en los extractos acuosos obtenidos del micelio de la CP-89 de <i>Agaricus</i> spp. contra la bacteria de <i>E. coli</i> (CPB-8).	50
<b>Figura 24</b>	Lecturas obtenidas a las 24 hrs ( $t_{24}$ ), con el lector de microplacas EPOCH (Biotek, USA) para la determinación del efecto antimicrobiano en los extractos acuosos obtenidos del micelio de la CP-89 de <i>Agaricus</i> spp. contra la bacteria de <i>E. coli</i> (CPB-8).	51
<b>Figura 25</b>	Lecturas obtenidas al tiempo cero ( $t_0$ ), con el lector de microplacas EPOCH (Biotek, USA) para la determinación del efecto antimicrobiano en los extractos etanólicos obtenidos del micelio de la CP-89 de <i>Agaricus</i> spp. contra la bacteria de <i>E. coli</i> (CPB-8).	52
<b>Figura 26</b>	Lecturas obtenidas a las 24 hrs ( $t_{24}$ ), con el lector de microplacas EPOCH (Biotek, USA) para la determinación del efecto antimicrobiano en los extractos etanólicos obtenidos del micelio de la CP-89 de <i>Agaricus</i> spp. contra la bacteria de <i>E. coli</i> (CPB-8).	54
<b>Figura 27</b>	Comparación de las lecturas obtenidas a las 24 hrs ( $t_{24}$ ), con el lector de microplacas EPOCH (Biotek, USA) para la determinación del efecto	55

	antimicrobiano entre los macerados, extractos acuosos y extractos etanólicos realizados a partir del micelio de las cepas CP-83 (A) y CP-89 (B) de <i>Agaricus</i> spp. contra la bacteria de <i>E. coli</i> .	
<b>Figura 28</b>	Cantidad de antioxidantes de los macerados obtenidos en agua (M1) y en tequila (M2) obtenido del micelio de la cepa CP-83 de micelio de <i>Agaricus</i> spp. a los 28 días de incubación.	56
<b>Figura 29</b>	Cantidad de antioxidantes de los extractos acuosos obtenidos en agua (A1), en tequila (A2) y en alcohol 80:20 (A3) obtenido del micelio de la cepa CP-83 de <i>Agaricus</i> spp. a los 28 días de incubación.	57
<b>Figura 30</b>	Cantidad de antioxidantes de los extractos etanólicos obtenidos en agua (E4), en tequila (E5) y en alcohol 80:20 (E6) de la cepa CP-83 de <i>Agaricus</i> spp. a los 28 días de incubación.	57
<b>Figura 31</b>	Cantidad de antioxidantes de los macerados (M1 y M2), extractos acuosos (A1, A2 y A3) y de los extractos alcohólicos (E4, E5 y E6) obtenido del micelio de la cepa CP-83 de <i>Agaricus</i> spp. a los 28 días de incubación.	58
<b>Figura 32</b>	Cantidad de antioxidantes de los medios líquidos obtenidos en agua (M1) y en tequila (M2) obtenido del micelio de la cepa CP-83 de <i>Agaricus</i> spp. a los 28 días de incubación.	59
<b>Figura 33</b>	Cantidad de antioxidantes de los macerados obtenidos en agua (M1) y en tequila (M2) obtenido de micelio de la cepa CP-89 de <i>Agaricus</i> spp. a los 28 días de incubación.	59
<b>Figura 34</b>	Cantidad de antioxidantes de los extractos acuosos obtenidos en agua (A1), en tequila (A2) y alcohol 80:20 (A3) obtenidos de micelio de la cepa CP-89 de <i>Agaricus</i> spp. a los 28 días de incubación.	60
<b>Figura 35</b>	Cantidad de antioxidantes de los extractos etanólicos obtenidos en agua (E4), en tequila (E5) y alcohol 80:20 (E6) obtenidos del micelio de la cepa CP-89 de <i>Agaricus</i> spp. a los 28 días de incubación.	60
<b>Figura 36</b>	Cantidad de antioxidantes de los macerados (M1 y M2), extractos acuosos (A1, A2 y A3) y de los extractos alcohólicos (E4, E5 y E6) obtenidos del micelio seco de la cepa CP-83 de <i>Agaricus</i> spp. a los 28 días de incubación.	61
<b>Figura 37</b>	Cantidad de antioxidantes de los medios líquidos obtenidos en agua (M1) y en tequila (M2) obtenidos del micelio seco de la cepa CP-89 de <i>Agaricus</i> spp. a los 28 días de incubación.	62
<b>Figura 38</b>	Cantidad de antioxidantes de 4 macerados (M1 y M2), 3 extractos acuosos (A1, A2, A3) y 3 extractos etanólicos (E4, E5, E6) obtenidos del micelio seco de las cepas CP-83 (A) y CP89 (B) de <i>Agaricus</i> spp.	65
<b>Figura 39</b>	Diagrama de flujo para el diseño del paquete tecnológico generado en esta investigación.	72
<b>Figura 40</b>	Estrategia propuesta para el aprovechamiento y uso de los recursos genéticos de las cepas de <i>Agaricus</i> .	73
<b>Figura 41</b>	Cinética de crecimiento de las cepas de <i>Agaricus</i> spp. en un periodo de incubación de 28 días de las cepas CP-43, CP-74, CP-500 y CP-501.	87
<b>Figura 42</b>	Colonización de las cepas CP-43 y CP-57 ( <i>Agaricus</i> ) en masters sin cal: yeso al mes de incubación.	88
<b>Figura 43</b>	Prueba de sensibilidad de la CP-89 ( <i>Agaricus</i> spp.) contra la cepa bacteriana <i>E. coli</i> (CPB-8).	91

- Figura 44** Crecimiento micelial por homogenización e incubación con agitación a 120 rpm de las cepas de *Agaricus* spp. (CP-43, CP-83, CP- 89, CP-123, CP-237, CP-500, CP-501, CP-503, CP-560) Tiempo de incubación 28 días. 92
- Figura 45** Crecimiento micelial por homogenización e incubación sin agitación de las cepas de *Agaricus* spp. (CP-43, CP-83, CP- 89, CP-123, CP-237, CP-500, CP-501, CP-503, CP-560) Tiempo de incubación 28 días. 93

## I. INTRODUCCIÓN

En México, el cultivo de hongos comestibles inició en el año de 1933, en un rancho cercano a Texcoco, Estado de México, propiedad del Sr. José Leben Zdravie (Martínez-Carrera *et al.*, 1991; Martínez-Carrera, 2000). Esto convirtió a México en el tercer país en producir hongos comestibles en América Latina, sólo antecedido por E.U.A. (1880) y Canadá (1912). Actualmente, la producción comercial de hongos comestibles en México ofrece notables ventajas sociales, económicas y ecológicas. Se estima que la producción comercial en fresco es de aproximadamente 47,468 toneladas anuales. La importancia ecológica de esta actividad económica radica en la utilización y reciclaje de más de 474,000 toneladas anuales de subproductos agrícolas, agroindustriales y forestales (Martínez-Carrera, 2002; Martínez-Carrera *et al.*, 2006). El cultivo de hongos en México ha evolucionado, a diferencia de otros países donde se ha desarrollado como un negocio netamente privado bajo dos vertientes principales: el desarrollo industrial privado y la producción rural por el sector social. Esta última es la más reciente, ya que se generó a partir de 1989 mediante el desarrollo del modelo sostenible de producción rural de hongos comestibles (Martínez-Carrera *et al.*, 1998). Sin embargo, en este contexto, es importante señalar que las setas, como se les conoce comercialmente a los hongos del género *Pleurotus*, sólo representan cerca del 4.62% de la producción comercial de hongos comestibles en México. Su cultivo es de hecho bastante reciente, ya que empezó en 1974 en Cuajimalpa, D. F., dentro de las instalaciones de “Hongos de México, S. A. de C. V.” (Martínez-Carrera *et al.*, 1991). En 1990, la producción anual estimada de setas en México fue de 356 ton (Martínez-Carrera *et al.*, 1992). A partir de este año, la producción comercial de setas se incrementó notablemente, alcanzando alrededor de 1,825 ton en 1997, lo que representó un incremento del 413% durante este período (Sobal *et al.*, 1997). Esta tendencia se mantuvo alcanzando una producción nacional estimada de 2,190 ton en el 2005 (Martínez-Carrera *et al.*, 2006).

El cultivo de los hongos inicia con la elaboración de la “semilla” (granos de trigo estéril colonizados por el hongo), seguido por la siembra en el sustrato, la colonización del mismo y la cosecha de los hongos. De gran importancia es el manejo postcosecha de los hongos, que va desde la presentación en fresco o el procesamiento de los hongos cosechados (recetas, deshidratación, liofilización, secado o como alimentos funcionales, principalmente). Durante el cultivo de los hongos comestibles no sólo se utilizan residuos agroindustriales como sustratos, sino que también se generan sustratos residuales, los cuales generalmente son acumulados fuera de las plantas productoras de hongos o regalados a las personas interesadas en usarlos directamente como abono. La composta es el producto que se obtiene del compostaje y constituye un grado medio de descomposición de la materia orgánica.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Importancia de los hongos

Los hongos están involucrados en numerosos fenómenos biológicos y químicos vinculados a la desintegración de la materia orgánica, procesos industriales de fermentación, producción comercial de medicamentos, alimentación humana y los sistemas de producción agroforestal. La importancia de los hongos en la alimentación humana reside en su valor dietético (bajo contenido en carbohidratos y grasas), significativo contenido de proteínas (de 20-40% del peso seco) y vitaminas, que los coloca por arriba de la mayoría de vegetales, frutas y verduras. Adicionalmente resultan ser complementos deliciosos en las comidas por sus propiedades organolépticas (Tormo, 1996).

En cuanto a la industria farmacéutica y productos medicinales, los hongos son de gran importancia. La penicilina por ejemplo, es un antibiótico bactericida derivado del moho *Penicillium notatum*, la cual actúa matando a las bacterias e inhibiendo su crecimiento. Otro caso particularmente interesante es el hongo lignocelulósico shiitake (*Lentinula edodes*) que en su composición contiene compuestos como el Lentinano y el KS-2 que poseen importante actividad antitumoral y anticancerígeno, además de activar el sistema inmune (inmunoactivador) logrando ser un potente hipoglicémico, reductor del colesterol entre otras propiedades (Sánchez y Royse, 2002).

Los hongos que crecen en sustratos lignocelulósicos tales como la madera o la paja, producen una mezcla de enzimas hidrolíticas y oxidantes que despolimerizan los componentes del sustrato, están constituidos esencialmente por celulosa (40 a 45%), hemicelulosa (20 a 23%) y lignina (30 a 35 %). Finalmente, el proceso de fermentación sólida utilizando hongo comestibles saprófitos, mejora la digestibilidad, aumenta el contenido de proteínas, vitaminas y minerales del sustrato residual.

## 2.2 Los hongos y su diversidad biológica

La recolección, caracterización y conservación de recursos genéticos han llegado a ser tema de importancia científica, biológica e industrial en todo el mundo, así como una estrategia fundamental para desarrollar las nuevas generaciones de cepas comerciales. Las poblaciones silvestres representan no solamente hongos para ser potencialmente cultivados, sino también una destacada fuente de productos biosintéticos y genes para investigación en ingeniería genética. La mayor parte de esfuerzos globales y regionales hasta ahora se han enfocado sobre los géneros de hongos comercialmente importantes, *Agaricus*, *Pleurotus*, y *Lentinula*. Latinoamérica es una región fundamental para la conservación de la biodiversidad del mundo. Seis países (Brasil, Colombia, Ecuador, México, Perú y Venezuela) de esta región están considerados como verdaderos lugares de megadiversidad. Sin embargo, es paradójico, que sólo haya unos cuantos programas para la recuperación, caracterización y conservación de germoplasma de hongos nativos, donde existe un notable desarrollo de la industria (Sobal *et al.*, 2007).

El entendimiento de los patrones de diversidad genética de las especies es fundamental no sólo para abordar asuntos que conciernen a los procesos evolutivos y al desarrollo de estrategias de conservación, sino también como un prerrequisito para el uso eficiente de los recursos genéticos en programas de reproducción. El interés en la estructura genética de las poblaciones naturales se ha incrementado en los últimos años debido a la necesidad de ampliar el conocimiento de la variación genética en las especies cultivadas. Nuevas técnicas para el estudio de la variación genética de especies silvestres a variedades cultivadas, mediadas por información sobre marcadores moleculares, son vías prometedoras para explotar los recursos genéticos silvestres. En el caso de los hongos, los programas de reproducción se pueden ver obstaculizados por la falta de datos sobre el grado de variación genética en las poblaciones naturales. En efecto, a pesar de la importancia económica de las especies en general o de los hongos en particular, poco se sabía acerca de su historia natural y biología

evolutiva. Por ejemplo, las fuerzas evolutivas que dan forma a las poblaciones naturales y la variabilidad genética disponible. El incremento en el conocimiento de la diversidad y características de las especies contribuirá directa e indirectamente a la comprensión del valor económico de la diversidad biológica. Asimismo, fortalecerá la iniciativa de preservar nuestros recursos biológicos existentes (Labarère y Bois, 2002; Urbanelli *et al.*, 2003).

### **2.3 Hongos comestibles y medicinales**

Los hongos se han usado como alimento desde tiempo inmemorial, los cuales pueden ser consumidos por sus propiedades organolépticas y/o valor nutricional. Las propiedades organolépticas se pueden juzgar por el color, textura y sabor, pero la determinación del valor nutricional requiere trabajo científico. Los análisis de la composición proximal de los hongos comúnmente cultivados revelan que estos son ricos en proteínas y carbohidratos, moderados en fibras crudas y cenizas, bajos contenidos de grasas. Los valores energéticos son bajos (Chang y Miles, 2004), pero contienen una buena fuente de aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales, potasio y fósforo son los dos elementos dominantes en la porción mineral; además, de poseer una cantidad considerable de tiamina, riboflavina, niacina y provitamina D2.

Los hongos medicinales tienen una historia establecida de uso en las terapias orientales tradicionales, donde se usaban fracciones hidrosolubles (cocimientos y esencias) de hongos como medicina en el Lejano Oriente, donde se originó principalmente el conocimiento y práctica del uso de los hongos. En las últimas dos décadas han habido un ascenso repentino en la utilización de los hongos como nutracéuticos y se ha investigado y autorizado completamente diversas especies comestibles para uso medicinal, por sus extractos que son vendidos como suplementos dietéticos.

Las especies que se han analizado en cuanto a valor medicinal son: *Ganoderma lucidum* ("Reishi"), *Lentinula edodes* ("Shiitake"), *Grifola frondosa* ("Maitake"),

*Agaricus blazei* (“Hime-matsutake”), *Cordyceps militaris* (“Hongo oruga”), *Pleurotus ostreatus* (“Hongo ostra”) y *Hericiium erinaceous* (“Cabeza de mono”). Hay muchas más especies de hongos cultivadas y silvestres comestibles y no comestibles que se han analizado en cuanto a sus componentes nutritivos y nutracéuticos, pero en menor grado que los enlistados. Los compuestos activos encontrados en los hongos son polisacáridos, fibras dietéticas, oligosacáridos, triterpenoides, péptidos y proteínas, alcoholes y fenoles, y elementos minerales (tales como zinc, cobre, yodo, selenio, hierro), vitaminas, y aminoácidos. Se ha encontrado que algunos compuestos bioactivos estimulan el sistema inmune, tienen propiedades anticancerígenas, actúan como agentes anti-hipercolesterolémicos y hepato-protectores, muestran actividad antiviral, y reducen los efectos secundarios de la quimio y radio-terapia (Lull *et al.*, 2005; Lakhanpal y Rana, 2005; Imtiaj y Tae-Soo, 2007).

Hay evidencia de que los hongos, siendo sistemas simples pero eucarióticos multicelulares, tienen mecanismos bioquímicos similares a los encontrados en los mamíferos. Se ha sugerido que debido a que algunos tejidos de vertebrados, tales como las glándulas y el sistema inmune, se han desarrollado recientemente en términos evolutivos. Algunas de las moléculas a través de las cuales estas células se comunican (hormonas y neuropéptidos) pueden haber aparecido mucho más temprano en la evolución de organismos unicelulares o multicelulares simples, tales como las bacterias y los hongos.

Muchos grupos de hongos, particularmente los hongos superiores, no han sido sistemáticamente investigados para buscar moléculas biológicamente activas. La síntesis de metabolitos secundarios a menudo está asociada con la diferenciación celular y, los complejos ciclos de vida de muchos hongos indican un considerable grado de diferenciación. De modo que es muy probable que los hongos altamente diferenciados, tales como los *Basidiomycetes* produzcan una rica serie de metabolitos secundarios. Finalmente, los hongos son excesivamente diversos y

abundantes, un hecho a menudo pasado por alto por los conservacionistas interesados en la biodiversidad global (Le Roith *et al.*, 1982; Fox, 1993).

## **2.4 El cultivo de hongos**

Debido a que muchos recursos naturales son limitados, la sustentabilidad se convierte en un importante concepto en el mantenimiento de la población humana, la salud, y el ambiente. El cultivo de hongos es una utilización directa de su papel ecológico en la bioconversión de los desechos sólidos generados de la industria y la agricultura en biomasa comestible, que también podía ser considerada como un alimento funcional o como una fuente de fármacos y productos farmacéuticos. Para hacer del cultivo de hongos una industria ambientalmente amigable, se deben investigar y desarrollar la biología básica de los hongos y la tecnología de cultivo.

## **2.5 La comercialización de los hongos silvestres**

Los hongos silvestres son consumidos en todo el mundo por sus reconocidas características gastronómicas, sus propiedades medicinales más apreciadas en Asia y México y porque recuerdan a muchas personas sus orígenes rurales.

Actualmente, además de usarlos en preparaciones culinarias, elaboran con ellos bebidas y cosméticos. Para los japoneses y los coreanos el matsutake es sin duda la especie silvestre más apreciada: el consumidor final puede pagar por un solo carpóforo fresco de primera calidad hasta 100 dólares estadounidenses. En Japón el matsutake es cotizado en la bolsa de valores. Por ser productos de estación e imposibles de cultivar cuando son de tipo ectomicorrícico, los hongos silvestres suelen deshidratarse o envasarse en aceite o salmuera para que puedan ser ofrecidos todo el año. En México, un caso muy conocido de comercialización de hongos comestibles silvestres es el del estado de Oaxaca donde existen tres canales principales de comercialización para los hongos que se producen en los mercados más importantes de la región de los Valles Centrales, es decir, las ciudades de Oaxaca y Tlacolula. En el Distrito Federal y el Estado de México,

durante la temporada de lluvias los hongos silvestres son ampliamente vendidos en los mercados de La Merced, la Central de Abasto, Jamaica, Cuajimalpa, Toluca, etcétera (Martínez–Carrera *et al.*, 1992).

Existen también empresas como Envasadora y Empacadora Pueblos Mancomunados (empresa forestal comunitaria de la Sierra Norte de Oaxaca) y Fungí de México que compran hongos silvestres a las comunidades de Oaxaca y del Estado de México para deshidratarlos o exportarlos en fresco. Comercializan los secos por medio de distribuidores nacionales de productos *gourmet* y en restaurantes europeos de la ciudad de México (Martínez–Carrera *et al.*, 1992).

## **2.6 Importancia de las propiedades funcionales de los hongos**

La vida celular incluyendo el ser humano, animales y plantas, están continuamente expuestos a altas variedades de estrés oxidativo. En un sistema biológico el estrés oxidativo se presenta después de exponerse a oxidantes, las células se convierten en rugosas esto se asocia con la generación de radicales libres, que son implicados en la patología de enfermedades, como el cáncer, artritis reumatoide, cirrosis y arteriosclerosis (Barros *et al.*, 2008).

Además de que la oxidación es uno de los procesos más importantes de deterioro de los alimentos, afectando el sabor, olor y textura. Las células están equipadas con varios sistemas de defensa contra radicales libres, incluyendo oxidación enzimas como SOD y catalasas, o compuestos químicos como los  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico, carotenoides, compuestos fenólicos y suplemento glutatinoide. Algunos, suplementos antioxidantes o alimentos que contienen antioxidantes, son usados para reducir la demanda oxidativa o protección de alimentos para prevenir el deterioro por la oxidación (Elmastas *et al.*, 2007). Los antioxidantes contenidos en alimentos, especialmente vegetales, son compuestos fenólicos. Diversas, técnicas se han usado y desarrollado como una alternativa, para la evaluación de diferentes extractos alimenticios, expresados en términos de “poder antioxidante” (Barros *et al.*, 2008).

Los hongos son una rica fuente de antioxidantes y en años se han reportado varios protocolos para determinar la actividad antioxidante basados en métodos espectrofotométricos (Tsai *et al.*, 2010). Los hongos son comúnmente utilizados como alimento y condimento, algunos han sido reportados como alimento terapéutico para la prevención de enfermedades como la hipertensión, colesterol y cáncer. Esta función característica hace que los hongos tengan un atractivo como alimento funcional y fuente de sustancias benéficas. Una de las maneras de evaluar el contenido de antioxidantes en los hongos es mediante la cantidad de fenoles totales, para ello se utilizan diversos métodos como el Folin-Ciocalteu para la evaluación de Flavonoides totales, aunque hay métodos enzimáticos que evalúan la actividad antioxidante total. Para ello se generan radicales libres como enzimas específicas, posteriormente estos radicales libres se inhiben por la presencia de los compuestos antioxidantes de extractos de los hongos (Soriano-Santos *et al.*, 2006).

## **2.7 Género *Agaricus***

El cultivo del champiñón se originó en Francia hacia el año 1650, productores de melón se dieron cuenta de que los champiñones se desarrollaban sobre compost usado procedente de las camas calientes del cultivo de melón. Observaron que los champiñones nacían con más frecuencia cuando regaban previamente el estiércol con agua utilizada para lavar los champiñones. Hacia el año de 1780, se descubrió que las galerías y cuevas reunían condiciones muy favorables para este cultivo (Vedder, 1966).

*Agaricus* requiere de temperaturas de 24-25°C en la etapa de crecimiento, y de 18-21°C en la etapa de fructificación, en el caso de *A. bitorquis* se desarrolla en temperaturas de 29-30°C en la etapa de crecimiento y de 25°C en fructificación, necesita concentraciones de CO<sub>2</sub> más altas. Sus carpóforos son más grandes y robustos pero presentan un crecimiento más lento y las oleadas son más distanciadas. Esta especie ha permitido el cultivo en lugares de clima relativamente cálido y en los meses veraniegos, aún sin disponer de mecanismos

para control del clima. El *A. subrufescens* es el menos cultivado. Es el más grande y llega a medir hasta 20 cm de diámetro (Pacioni, 1987; Sobrino y Sobrino, 1994).

El champiñón, como todo hongo, carece de clorofila, por lo que obtiene su alimento por absorción de compuestos inorgánicos y orgánicos de los substratos donde se desarrollen (Chang y Miles, 1989). La mayor parte de sus nutrientes los obtiene de la lignina, celulosa, hemicelulosa y proteína, por lo que se desarrollan en substratos que son principalmente desechos o subproductos de la agricultura, tales como rastrojo de cereales, etc., los cuales de otra forma serían desechados. Se designa como champiñón a la parte reproductora visible y carnoso que se desarrolla por encima del suelo. Su parte vegetativa está formada por una red de finísimos filamentos llamados hifas, los cuales al entrelazarse dan origen al micelio. Cuando las hifas se entrelazan en forma compacta dan origen al carpóforo (Vedder, 1966).

Los órganos reproductores de hongos se encuentran situados sobre estructuras conocidas como cuerpos fructíferos, carpóforos o esporocarpos. Estos producen las esporas, las cuales al estar en contacto con el substrato adecuado germinan produciendo una hifa, la cual dará origen al micelio (Pacioni, 1987). Según Kinrus (1976), un hongo produce alrededor de 60 billones de esporas, de las cuales en la naturaleza, sólo uno de un billón sobrevive. El carpóforo desarrollado se compone de dos partes: el pie (estípite) y el sombrero (píleo). El pie está constituido por un conjunto de filamentos apretados, generalmente cilíndricos y de longitud variable. El velo es una especie de membrana que une el sombrero con el pie y que recubre el himenio, el cual se desgarrará durante su desarrollo y liberación de las esporas. El sombrero es el órgano protector del himenio, es de textura parecida a la del pie, globuloso antes de la madurez, y se extiende después de la ruptura del velo para pasar a ser ligeramente cóncavo por el levantamiento de los bordes (Rigau, 1985; Deacon, 1990).

## 2.8 Importancia del champiñón

Es difícil disponer de cifras exactas de la importancia del cultivo de champiñón en todos los países de mundo. No obstante, según las cifras publicadas por Chang (1999), en 1997 la producción fue de 1,956,000 toneladas métricas, lo cual representa el 31.8% del total de hongos comestibles producidos en el mundo. Sus características organolépticas y usos en gastronomía, hacen del cultivo del champiñón uno de los hongos comestibles más conocidos y consumidos en el mundo.

En muchos países, la elevación del nivel de vida ha llevado consigo un cambio en los hábitos alimenticios, disminuyendo el consumo de alimentos con elevado valor energético y aumentando la necesidad de una dieta rica en proteínas, vitaminas y minerales. Debido a su composición, el champiñón posee particular importancia con relación a este aspecto. El contenido nutricional siempre vendrá condicionado por varios factores, si es silvestre o cultivado, el medio en que crece (contenidos de humedad y materia orgánica), el tipo de sustrato y las condiciones de manejo en que se cultiva.

Los champiñones pueden cubrir en parte, los requerimientos de proteína en la nutrición humana, ya que el contenido en ellos oscila entre 2.95 y 3.7 por ciento del peso fresco, con valor nutritivo superior al de la mayor parte de hortalizas. El champiñón es útil en caso de personas con problemas con la digestión de la carne porque contiene proteínas fácilmente asimilables. Es bajo en carbohidratos y grasas, sólo proporciona 27 calorías en 100 gramos de peso fresco, importante para dietas depurativas o para perder peso (**Cuadro 1**). El contenido de colesterol es nulo. Es rico en varias vitaminas como vitamina A (especialmente los silvestres), tiamina (B1), riboflavina (B2), ácido ascórbico (vitamina C) que se pierde si no son frescos, ergosterina (pro-vitamina D2) y la biotina (vitamina H). También contiene un importante nivel de ácido fólico que puede estimular la curación de la anemia. Más que una cantidad importante de minerales, contiene

variedad de estos, destacando el contenido en fósforo, magnesio y potasio. Su contenido en selenio le confiere un efecto antioxidante (Vedder, 1966).

En recientes investigaciones se ha encontrado también que en el champiñón contiene sustancias que permiten disminuir el contenido de colesterol y de glucosa en la sangre, detienen la evolución del cáncer y combate el SIDA. Siendo 3.32% el contenido promedio de proteína en los carpóforos del champiñón y 89% el contenido de humedad, resulta que dicho contenido de proteína equivale a 30.23% del peso seco del hongo.

**Cuadro 1.** Comparación nutricional del champiñón (%) en base al peso fresco.

Componente	Champiñón	Espinacas	Papas	Leche	Carne
Agua	88-90	93	75	87	60
Proteína	2.95-3.70	2.2	2	3.5	18
Grasas	0.25-0.30	0.3	0.1	3.7	14.8
Carbohidratos	4.00-6.80	1.0	21	4.8	0.3
Minerales	1.00	1.9	1.1	0.7	0.5
Fibras	1.00	1.6	0.8	0.3	0.4
Calorías	27	23	87	60	214
Valor nutritivo	22	26	9	25	43

Fuente: Setas de Cuivá (2007) y Agrobot (2005)

Número de calorías: equivale a la cantidad de calorías en 100 g de hongos frescos. Valor nutritivo: Equivale a la cantidad de aminoácidos esenciales por las proteínas sobre cien.

## 2.9 Valor nutritivo

El champiñón contiene las vitaminas necesarias para el desarrollo del hombre, como son: tiamina (B1), riboflavina (B2), piridoxina (B6), ácido pantoténico, ácido nicotínico, ácido fólico, ácido ascórbico (Vit. C) y ergosterol (provitamina D2). Su consumo disminuye el contenido de colesterol en la sangre y ayuda en la prevención contra la anemia y el cáncer. También contiene proteínas y los aminoácidos esenciales para el hombre (lisina, metionina, triptófano, treonina, valina, leucina, isoleucina, histidina, fenilalanina). Además, contiene elevadas cantidades de fósforo, sodio, potasio; en menor proporción, calcio y fierro (Vedder, 1966).

## **2.10 Estado actual del champiñón en México**

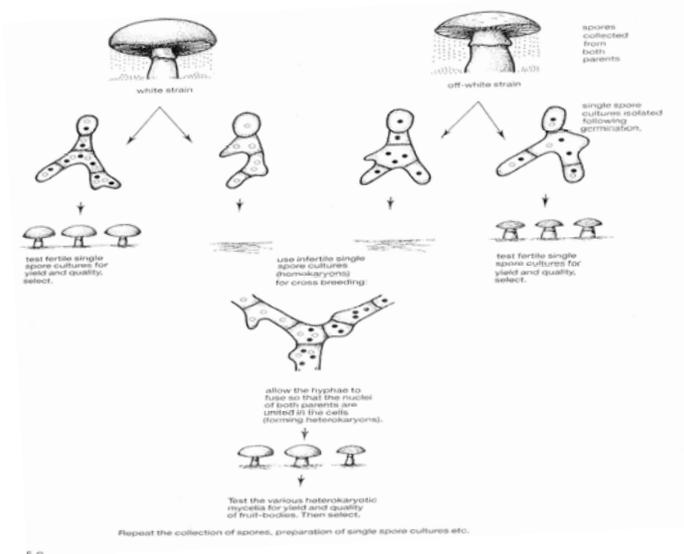
La producción a nivel mundial del champiñón *Agaricus*, constituye el 38% de los hongos comestibles cultivados (2,424,000 ton), seguido de *Pleurotus* spp., con el 24%; *Auricularia*, 11%; *Lentinula edodes*, 10%; *Volvariella*, 6%; *Flammulina*, 4%; *Tremella*, 5% y otros con el 2% (Gea, 2002).

Actualmente, en México no se cuenta con cifras exactas y periódicas; sin embargo, puede considerarse que a escala nacional la producción de champiñón *Agaricus* rebasan las 23 toneladas diarias; es decir 8,418 toneladas de hongo fresco al año (Martínez- Carrera *et al.*, 1992). El cultivo de hongos en México hizo su aparición en el año de 1930 y para 1947 se formó la primera asociación, de la cual nació la empresa Hongos Leben de México, lo que hoy se conoce como Grupo Monte Blanco S.A. (Martínez-Carrera *et al.*, 1992). Al principio de 1990, se constituyeron varias industrias productoras de champiñón y otros hongos en varios estados de la República Mexicana; tales como PROVEMEX S.A. de C.V., hoy champiñones de Los Altos (Grupo Monte Blanco); Champiñones de Occidente en el estado de Jalisco; Gigante Verde, hoy Champiñones San Miguel (Guanajuato); Champiñones de Camargo (Chihuahua); Champiñones Las Capillas (San Luis Potosí); Agroindustrias MARVEX, en Toluca (Estado de México); Industria Champiñonera “El Riojal” Las Vigas de Ramírez, Perote, Veracruz; La Michoacana de Champiñones (Michoacán); Alimentos Selectos de Tlaxcala (Tlaxcala) y actualmente algunas otras que están en vías de construcción en los estados de Jalisco, Nuevo León, Tlaxcala, Puebla, Oaxaca, Veracruz, Hidalgo y Chiapas y en los próximos cinco años se estima que la producción y consumo se incrementará en un 100 % (Martínez- Carrera *et al.*, 2007).

## **2.11 Ciclo biológico del champiñón (*Agaricus*)**

El ciclo de vida del champiñón *Agaricus bisporus*, es una sucesión de etapas, que va desde la germinación de esporas hasta la formación de cuerpos fructíferos. Bajo condiciones adecuadas (humedad relativa, temperatura, pH del sustrato) las esporas de *Agaricus bisporus* desarrollan un tubo “germinal” que crece y origina

una hifa, la que se ramifica formando así un conjunto de micelio primario, el cual continúa ramificándose hasta formar el micelio secundario. El cual es desde el punto de vista funcional similar al sistema radicular de los vegetales, ya que la absorción de los nutrientes se efectúa por este medio; además, tiene la función de anclar los esporóforos al sustrato. Esta primera etapa de crecimiento micelial se conoce como fase vegetativa. El cambio de las condiciones ambientales (temperatura, humedad relativa y ventilación) induce al organismo a pasar de un desarrollo vegetativo a uno generativo (fase generativa). Al inicio de esta fase se forman primordios, con la unión de hifas, que crecen y dan origen a la estructura visible, comúnmente conocido como hongo, champiñón o científicamente conocido como cuerpo fructífero o esporóforo. El desarrollo de este empieza con la aglomeración de filamentos del micelio que van a formar una pequeña esfera denominada primordio o cabeza de alfiler (**Figura 1**). Después de unos días, el primordio alcanza el tamaño de un chícharo y posteriormente se distingue un estípite y un píleo. Cuando madura el esporóforo se producen las esporas sexuales en la parte inferior del píleo, comúnmente conocido como sombrero (Leal, 1985).

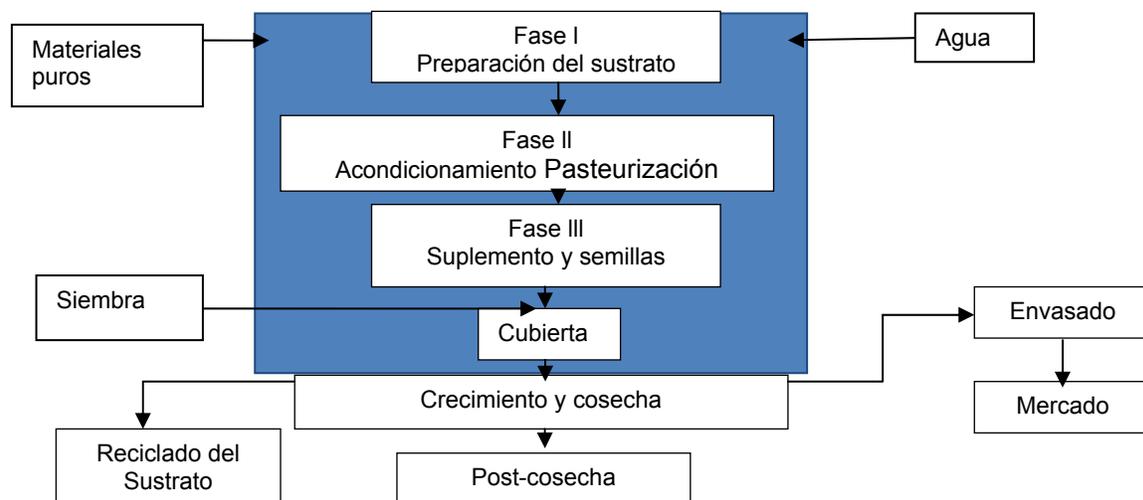


**Figura 1.** Ciclo biológico de *Agaricus bisporus* (Tomado de Van Grienseven ,1988).

## 2.12 Fisiología

Los hongos son heterótrofos y obtienen sus nutrientes absorbiendo materia orgánica e inorgánica soluble de sustrato. Las fuentes de carbono proveen lo necesario para formar compuestos orgánicos y energía para los procesos anabólicos. El nitrógeno es necesario para formar aminoácidos, proteínas y enzimas. Las necesidades de nitrógeno quedan cubiertas por las proteínas y aminoácidos que resultan de la degradación química y biológica del sustrato (Chang y Miles, 1989; Moll, 1986). Los alimentos carbonados más útiles para el micelio son la hemicelulosa, la celulosa, la lignina y determinados azúcares, según Rigau (1985), las ligninas representan el alimento por excelencia, estas se encuentran en cantidades abundantes en el estiércol de caballo y la paja de los establos, enriquecidos con nitrógeno y suplementado con la incorporación de abono nitrogenado. Estos suplementos no son asimilados en forma directa, sino que deben ser transformados en proteínas y aminoácidos por medio del proceso de fermentación llamado compostaje (Moll, 1986). No soporta las sales amoniacales más que en concentraciones muy débiles y no asimilan los nitratos (Vedder, 1966). El proceso de producción de champiñón, se esquematiza en la

**Figura 2.**



**Figura 2.** Proceso de producción del hongo *Agaricus bisporus* (Tomado de Martínez-Carrera, 2000).

El cultivo del champiñón es afectado por diversos problemas fitosanitarios que son ocasionados por hongos, bacterias, virus y así como por otras anomalías en el desarrollo y trastornos de crecimiento, que no son verdaderas enfermedades sino la consecuencia de malas condiciones ambientales en los locales de cultivo o de anomalías genéticas en el micelio (Vedder, 1966). Otros factores que afectan el cultivo son las fallas en el proceso de compostaje, sus variaciones en el contenido de nitrógeno y los componentes del sustrato como son el origen del estiércol y la procedencia de la paja. El tiempo de compostaje determina la cantidad de microorganismos presentes al final del proceso; el más eficiente es el método corto y la pasteurización de la composta ya que disminuye la incidencia de hongos competidores hasta en un 96%. Existen otros factores bióticos y abióticos que influyen en el rendimiento y calidad del champiñones donde los factores bióticos (plagas y enfermedades) con frecuencia producen los síntomas más evidentes, aunque ciertos factores abióticos como la temperatura y la disponibilidad de agua pueden tener efectos similares (Fletcher *et al.*, 1997).

### **2.13 Propiedades funcionales y antimicrobianas del champiñón**

Hoy en día el desarrollo de resistencia por un patógeno que muchos de los antibióticos de uso común suponen un impulso para la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos que sean capaces de combatir infecciones. Esta situación obligó a los científicos a la búsqueda de nuevas sustancias antimicrobianas a partir de varias fuentes que tengan el potencial de ser fuentes de nuevos agentes antimicrobianos. De las pocas investigaciones realizadas, se ha reportado que *Agaricus blazei* posee actividad antitumorales e inmunológicas (Kawagishi *et al.*, 1989) y su uso para la prevención de cáncer. Sin embargo, no ha habido muchos estudios sobre la actividad antimicrobiana de las especies de *Agaricus* hasta la fecha, a pesar de ser el hongo más cultivado en el mundo.

### III. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

Los hongos comestibles, especialmente los basidiomicetos, son ampliamente utilizados como alimento humano (Chang, 1989). Tradicionalmente, los estudios de nutrición en los hongos comestibles se han concentrado en sus cuerpos fructíferos (Litchfield, 1967; El-Kattan *et al.*, 2001). Sin embargo, la obtención del cuerpo fructífero del hongo comestible *Agaricus* spp. es un proceso largo y complejo, el cual se lleva a cabo comercialmente en México utilizando cepas extranjeras (Solomons, 1975). Los hongos comestibles de lento crecimiento como los pertenecientes al género *Agaricus* requieren de una cuidadosa propagación, razón por la cual han sido poco estudiados. Dada la biodiversidad tan amplia que existe en México, es paradójico que no se hayan investigado las propiedades funcionales de los recursos genéticos nativos de champiñón silvestre. En este trabajo, se aislaron y se secuenciaron cepas silvestres de *Agaricus* depositadas en el Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales (CREGENHC), las cuales fueron caracterizadas en lo que respecta a sus propiedades funcionales (antioxidantes y antimicrobianas). Asimismo, no se cuenta con una estrategia nacional para el aprovechamiento de los hongos silvestres.

## IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### Hipótesis

Las especies silvestres de *Agaricus* spp. provenientes de zonas rurales de México, poseen propiedades antioxidantes y antimicrobianas.

### Objetivo general

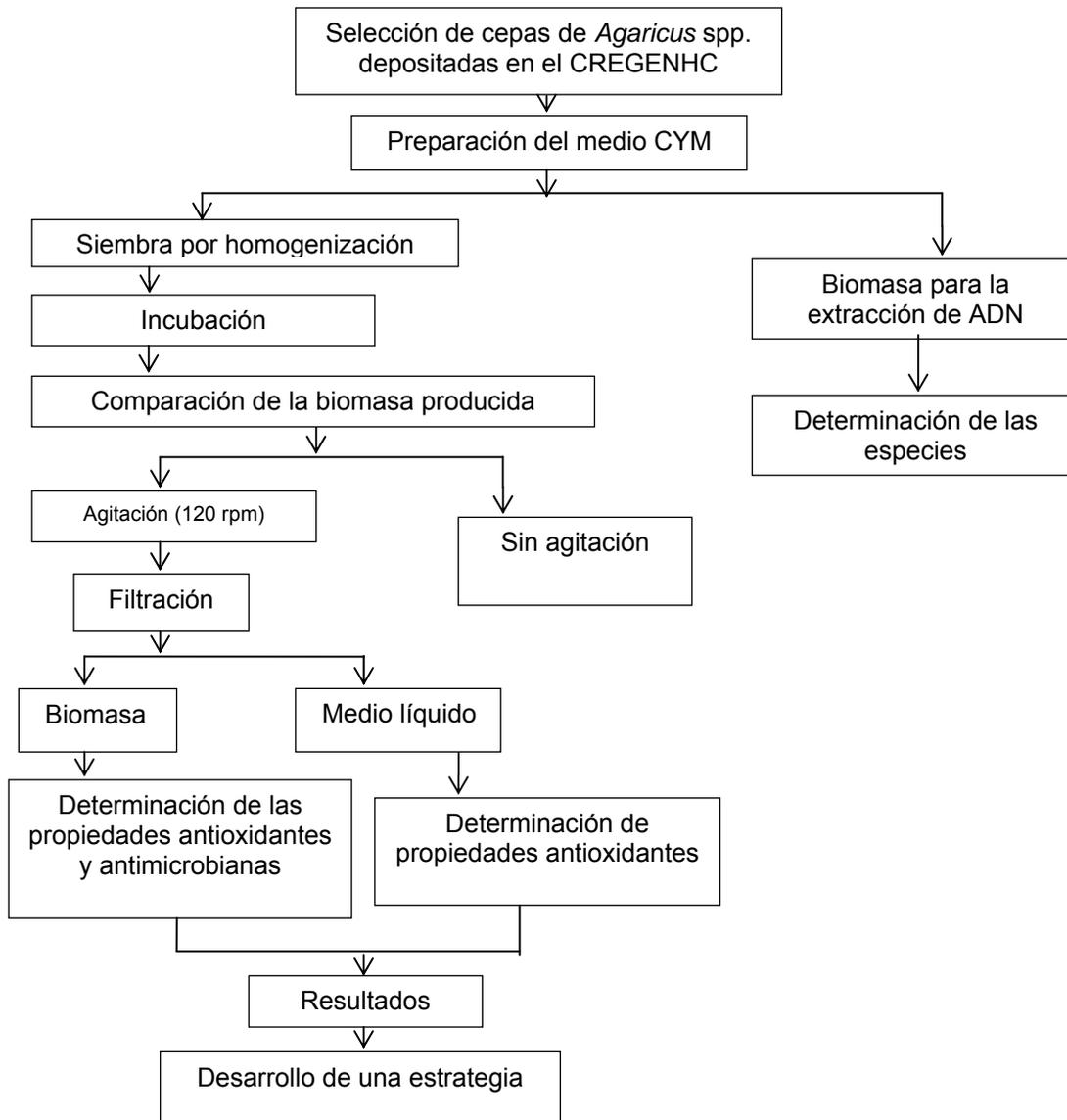
Determinar las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de las cepas silvestres de *Agaricus* spp. de México.

### Objetivos particulares

- Determinar las condiciones de cultivo que favorecen la producción de biomasa de las cepas seleccionadas silvestres de *Agaricus* para un mejor manejo en condiciones del laboratorio.
- Determinar las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de las cepas seleccionadas de *Agaricus* spp.
- Desarrollar una estrategia para el aprovechamiento de los recursos genéticos nativos de champiñón silvestre (*Agaricus*), con base en sus propiedades funcionales y potencial de cultivo a nivel de pequeña y gran escala.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de Hongos Comestibles Funcionales y Medicinales del Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla. En la **Figura 3** se muestra el esquema de trabajo que se siguió en la presente investigación.



**Figura 3.** Diagrama de flujo del trabajo realizado para determinar las propiedades funcionales antioxidantes y antimicrobianas de cepas nativas de *Agaricus* spp.

## 5.1 Material biológico

El material biológico utilizado en la presente investigación se encuentra depositado en el CREGENHC (Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales) del Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla. Las cepas se mantienen y resemanan en medio de cultivo completo para levaduras (CYM). La clave y la procedencia se pueden ver en el **Cuadro 2**.

**Cuadro 2.** Cepas de *Agaricus* utilizadas durante la investigación.

Clave	Especie	Procedencia
CP-43	<i>Agaricus bitorquis</i>	Tailandia
CP-57	<i>Agaricus bitorquis</i>	Tailandia
CP-74	<i>Agaricus</i> spp.	Tecali, Puebla
CP-83	<i>Agaricus</i> spp.	El Oasis, Valsequillo, Puebla
CP-89	<i>Agaricus</i> spp.	Chiapas
CP-99	<i>Agaricus bitorquis</i>	Europa
CP-123	<i>A. subrufescens</i>	Puebla
CP-237	<i>A. tollocanesis</i>	Ciudad de Puebla
CP-500	<i>Agaricus</i> spp.	Colegio de Postgraduados, <i>Campus</i> Puebla
CP-501	<i>Agaricus</i> spp.	Colegio de Postgraduados, <i>Campus</i> Puebla
CP-502	<i>Agaricus</i> spp.	Colegio de Postgraduados, <i>Campus</i> Puebla
CP-503	<i>Agaricus</i> spp.	Colegio de Postgraduados, <i>Campus</i> Puebla
CP-504	<i>Agaricus</i> spp.	Colegio de Postgraduados, <i>Campus</i> Puebla
CP-505	<i>Agaricus</i> spp.	Colegio de Postgraduados, <i>Campus</i> Puebla
CP-560	<i>Agaricus</i> spp.	Colegio de Postgraduados, <i>Campus</i> Puebla

## 5.2 Preparación del medio de cultivo CYM líquido

El medio de cultivo completo para levaduras (CYM) líquido contiene la siguiente composición (g/L); 20 g de dextrosa, 2 g de peptona, 2 g de extracto de levadura, 0.5 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.46 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Posteriormente, del medio se

tomaron 100 mL para colocarlos en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Finalmente, todo se esterilizó a 121 °C durante 25 min. Se realizaron 10 matraces por cepa.

### **5.3 Producción de biomasa**

La siguiente sección detalla la producción de biomasa producida a los 28 días de incubación bajo dos condiciones (120 rpm y sin agitación). La mejor condición que produjo biomasa suficiente fue usada como muestra para analizar las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de las dos cepas seleccionadas de *Agaricus* spp. (CP-83 y CP-89).

#### **Preparación del inoculó por homogenización**

La preparación del inoculó por homogenización se realizó de la siguiente manera: 3 inoculós con diámetro de 0.5 cm de cada cepa previamente cultivada se colocaron en vasos metálicos estériles con 1 mL agua destilada estéril, los cuales se homogenizaron con un homogenizador PRO250 (PreScientific, USA) a 11030 rpm por un minuto y cincuenta segundos.

#### **Siembra**

De la mezcla obtenida por la homogenización se utilizaron 150 µl para inocular cada uno de los matraces con 100 mL de medio de cultivo CYM por cepa.

#### **Incubación a 120 rpm y sin agitación**

Cinco matraces Erlenmeyer con medio de cultivo inoculado se incubaron a 120 rpm en una incubadora orbital MaxQ4000 (Thermo Scientific) y, los otros 5 se incubaron sin agitación, los matraces se incubaron a temperatura ambiente. Este procedimiento se realizó para ambas cepas hasta su cosecha a los 28 días de incubación.

#### **Recuperación de la biomasa micelial**

La biomasa micelial de cada cepa en ambas condiciones de incubación (120 rpm y sin agitación) se recuperaron filtrando el micelio de cada matraz con papel filtro

Whatman No. 1 estériles, en un embudo buchner al que se le aplicó vacío. El micelio junto con el papel filtro se colocaron en un horno a 40°C por 24 horas. El micelio seco se guardó en bolsas de plástico con los datos de cada cepa (fecha de siembra, fecha de cosecha, número de cepa y tratamiento). La biomasa obtenida por agitación se guardó en un ultracongelador a -25°C hasta su uso. Por otro lado, el medio líquido CYM al final de la cinética, se guardaron para realizar la prueba de antioxidantes.

#### **5.4 Aislamiento del ADN, amplificación del ITS y secuenciación**

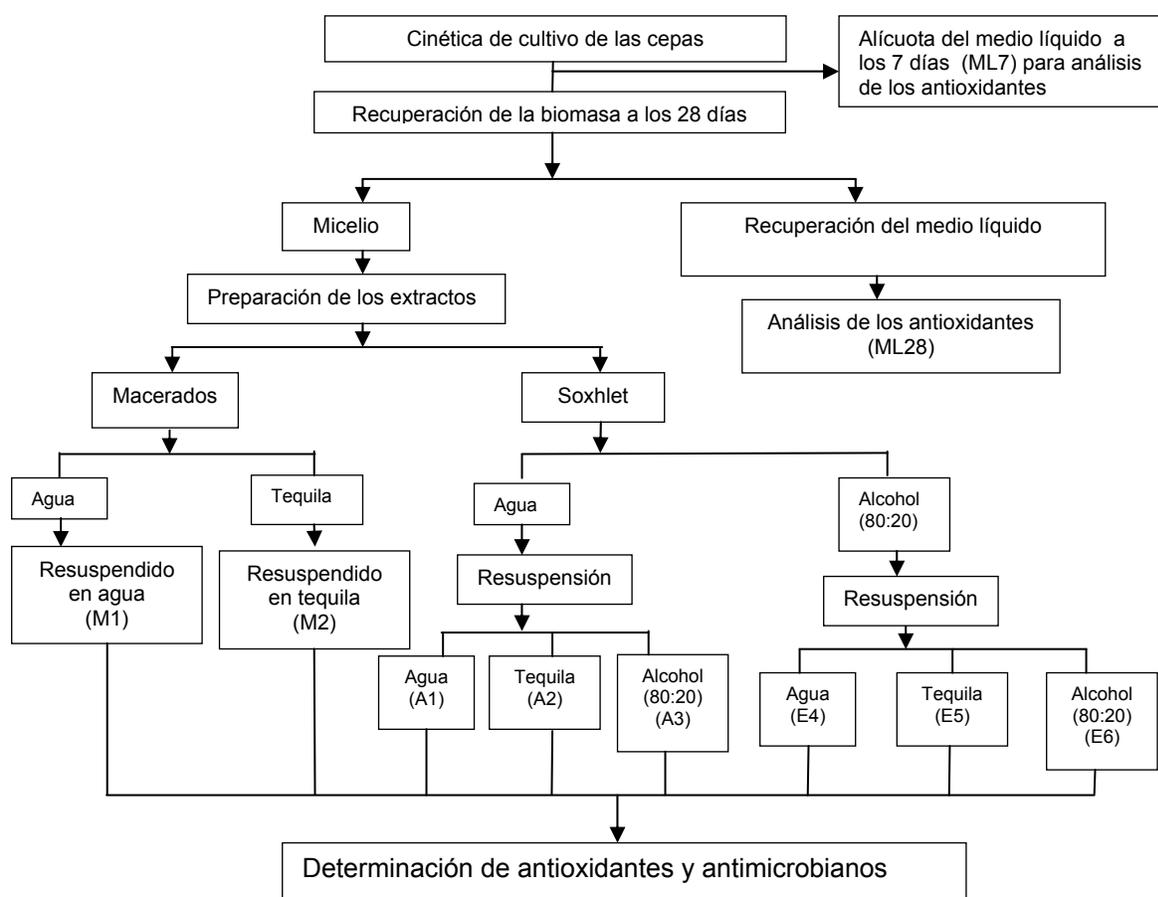
La metodología utilizada en el siguiente apartado se realizó de manera paralela a la presente investigación, contando con el apoyo de los profesores que conformaron mi consejo particular.

El micelio de cada una de las cepas se cultivó en medio líquido CYM, como lo descrito anteriormente. Una vez desarrollado el micelio, se cosechó con una espátula estéril y se colocó en papel filtro estéril y se eliminó el exceso de medio de cultivo, posteriormente se transfirió en tubos Eppendorf de 1.5 mL. estériles y se sumergieron en nitrógeno líquido. Las muestras se liofilizaron en un Freeze Dry System/freezone 4.5 (Labconco, E.U.A.). La extracción del ADN se llevó a cabo por el método de Challen *et al.*, (1995). El ADN obtenido se visualizó y cuantificó en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio de acuerdo con Sambrook *et al.*, (1989). La amplificación de la región ITS se realizó usando los primeros o iniciadores ITS1 e ITS4 (White *et al.*, 1990). Las condiciones del PCR fueron las siguientes: 1 ciclo de 94°C durante 1 min.; 25 ciclos de 94°C, 30 seg; 50°C, 45 seg; 72°C, 5 min; y un ciclo final de 72°C, 5 min. Los productos del PCR se visualizaron y cuantificaron en gel al 1% de agarosa con bromuro de etidio (Sambrook *et al.*, 1989). Los productos del PCR se purificaron con el QIAQUICK PCR purification Kit (QIAGEN, USA) y enviados para su secuenciación a la empresa SEQWRIGHT, INC. Houston Texas, USA.

Análisis filogenético: el alineamiento de las secuencias se llevó a cabo por el método de CLUSTALW, usando como grupo externo a *Chlorophyllum*, por medio del programa MEGA4 (Tamura *et al.*, 2007). El análisis filogenético se realizó usando el criterio de Máximo Parsimonia por medio del programa MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007).

### 5.5 Preparación de los extractos miceliales

La **Figura 4** muestra el diagrama de flujo utilizado para la obtención de los extractos con el micelio obtenido por agitación (120 rpm), para la determinación de sus propiedades antioxidantes y pruebas antimicrobianas en cada una de las cepas en estudio.



**Figura 4.** Diagrama general de la obtención de los extractos para la determinación de las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de las cepas de *Agaricus*.

El **Cuadro 3** muestra las claves que se le asignaron y la descripción de cada uno de los extractos utilizados.

**Cuadro 3.** Clave de los extractos y análisis realizados en las cepas de *Agaricus* spp. cultivadas en medio de cultivo CYM líquido a 120 rpm.

Clave	Composición de la muestra	Análisis realizados
A1	Extracto acuoso resuspendido en agua.	Am, Ax
A2	Extracto acuoso resuspendido en tequila.	Am, Ax
A3	Extracto acuoso resuspendido en una solución alcohólica (80:20).	Am, Ax
E4	Extracto alcohólico (80:20) resuspendido en agua.	Am, Ax
E5	Extracto alcohólico (80:20) resuspendido en tequila.	Am, Ax
E6	Extracto alcohólico (80:20) resuspendido en solución alcohólica (80:20).	Am, Ax
M1	Macerado acuoso resuspendido en agua.	Am, Ax
M2	Macerado tequila resuspendido en tequila.	Am, Ax
ML7	Alícuota del medio de cultivo CYM líquido (ML) a los 7 días de incubación.	Ax
ML28	Medio de cultivo CYM líquido (ML) al término de la cinética (28 días).	Ax

Am= Antimicrobianos. Ax= Antioxidantes.

### **Obtención de los extractos A1, A2, A3 y E4, E5, E6**

El equipo utilizado para la obtención de los extractos fue un Soxhlet PC 1500 6x6, utilizando agua destilada para los extractos acuosos a temperatura de 100°C, por 10 ciclos con una duración aproximada de 5 horas. Por otro lado, para la obtención de los extractos alcohólicos se usó una temperatura de 40°C, con 10 ciclos durante 2 horas. De cada cepa se pesaron 0.2 g de micelio seco obtenido por agitación y se colocaron en un cono de papel filtro Whatman No.1, para realizar los dos tipos de extracción:

- 1) El primer extracto se obtuvo en 150 mL de agua destilada a 100°C con 10 ciclos.
- 2) El segundo extracto se realizó en una solución etanol:agua (80:20) a 40°C por 10 ciclos.

Cada extracto se dividió en tres alícuotas de 40 mL, las cuales se concentraron por separado en un Rotavapor HAHN VAPOR 2000 NS, hasta alcanzar aproximadamente 1 mL de volumen final. Posteriormente, las alícuotas de los

extractos acuosos fueron resuspendidas por separado en 2 mL de agua (A1), 2 mL tequila (A2) y 2 mL solución alcohólica (80:20) con clave A3. Las alícuotas de los extractos alcohólicos también fueron resuspendidas por separado en 2 mL de agua (E4), 2 mL tequila (E5) y 2 mL solución alcohólica (80:20) con clave E6. Las muestras se colocaron en tubos eppendorfs estériles de 2 mL, almacenándose en un ultracongelador REVCO a -24°C hasta su análisis.

### **Obtención de macerados M1 y M2**

De igual forma se pesaron 0.2 g de micelio seco y se colocaron en un cono de papel filtro Whatman No.1, las muestras se introdujeron en frascos de vidrio estériles de 250 mL con 150 mL de agua ó tequila. Se dejaron reposar durante 24 horas en condiciones de obscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente, se recuperaron los dos extractos (macerados) llevándolos cada uno a evaporación en el rotavapor, hasta alcanzar aproximadamente 1 mL de volumen final. Después, el macerado acuoso fue resuspendido en 2 mL de agua (M1) y, el macerado tequila fue resuspendido en 2 mL tequila (M2). Las muestras se colocaron en tubos eppendorfs estériles de 2 mL, almacenándose también en el ultracongelador REVCO -24°C hasta su análisis.

### **Obtención de la alícuota ML7 y medio líquido residual (ML28) para la determinación de antioxidantes**

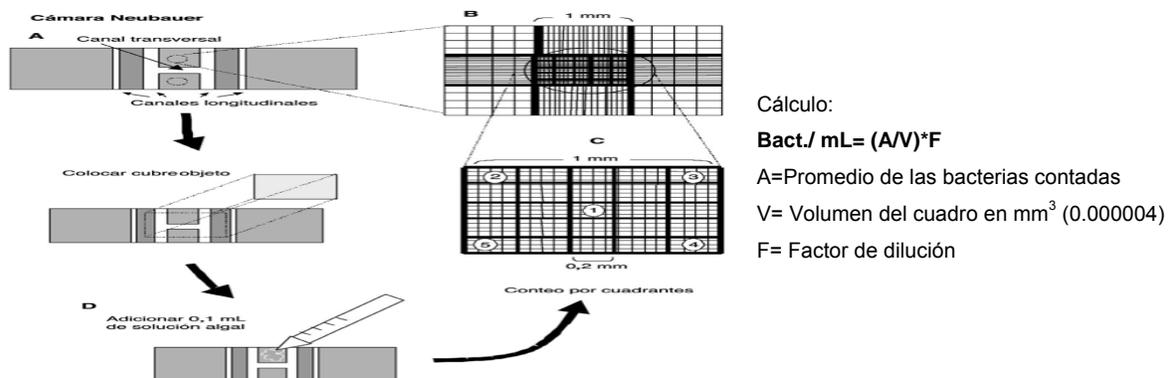
Se tomó una alícuota de 10 mL del medio de cultivo CYM en condiciones de esterilidad a los 7 días de incubación (ML7) de cada cepa. Por otro lado, el medio líquido residual se recuperó al momento de la cosecha del micelio a los 28 días de incubación (ML28). La alícuota y 10 mL de medio líquido residual se guardaron en tubos Falcon estériles de 20 mL y, se almacenaron también en el ultracongelador REVCO a -24°C hasta su uso.

## 5.6 Preparación de la prueba antimicrobiana utilizando la cepa CPB-8 de *Escherichia coli* (ATCC 25922)

Para esta prueba se utilizó la cepa de *Escherichia coli* (CPB-8) con número ATCC 25922, la cual se resembró periódicamente en medio de cultivo Muller Hinton Broth (Bioxón) cada 3 meses.

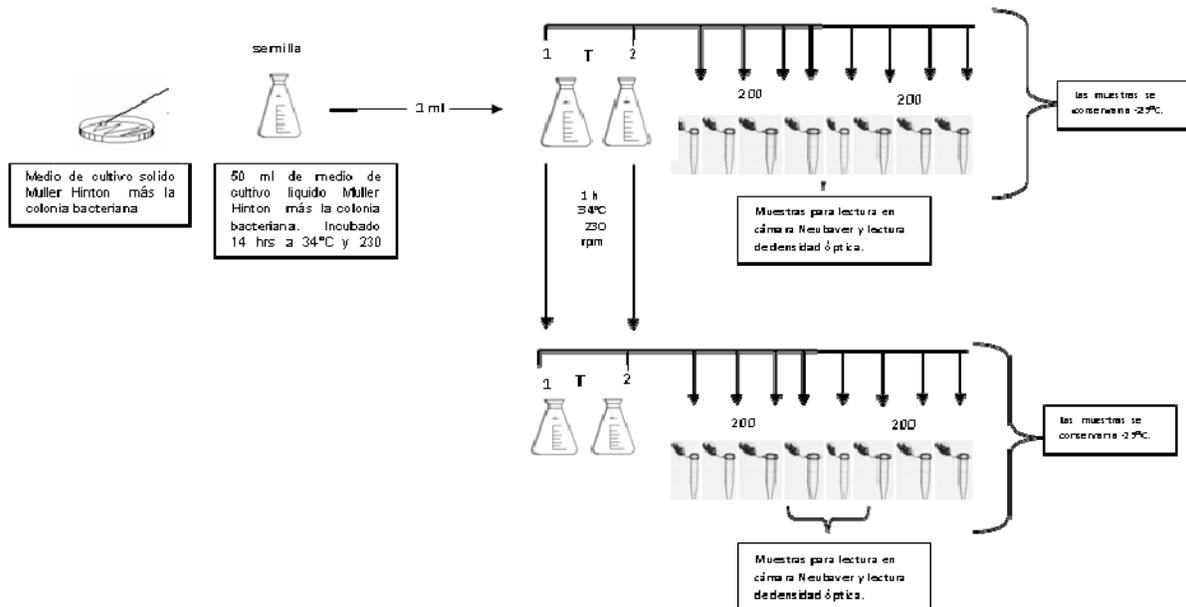
### Cinética de crecimiento de *E. coli*

Para realizar la cinética de crecimiento de *Escherichia coli*, primero se necesitó producir el inóculo "semilla". Este inóculo se realizó tomando una asada de la bacteria crecida previamente en Muller Hinton (DIFCO) agar a 48 horas de incubación. Con la asada se inocularon 50 mL de medio de cultivo líquido Muller Hinton Broth (Bioxon), e incubando la bacteria por 14 horas a 34°C y 230 rpm en un incubador orbital MaxQ4000 (Thermo Scientific). Pasado ese tiempo, se tomó 1 mL de inóculo y se sembró en 50 mL del mismo medio por 48 horas y las mismas condiciones de temperatura y agitación con el objeto de alcanzar una D.O. de 0.04 y una concentración de bacterias de  $1.45 \times 10^9$  UFC. Para ello cada hora se tomaron 4 muestras de 200  $\mu$ l por matraz para contabilizar el número de bacterias (UFC) y medir la densidad óptica (D.O.) que se necesitan como valores iniciales para realizar la prueba antimicrobiana. El conteo de las bacterias se llevó a cabo en la cámara de Neubauer, como se muestra en la **Figura 5**. En la **Figura 6**, se muestra el proceso general que se realizó para la cinética bacteriana.



**Figura 5.** Método de lectura de la cinética bacteriana contada en la cámara de Neubauer.

La densidad óptica (D.O.) se leyó con 100  $\mu$ l de cada cultivo en una microplaca estéril en forma de "U" de 96 pozos (Vacutest, Kima), en un espectrofotómetro de microplacas Biotek (USA) a 600 nm.



**Figura 6.** Forma en la que se realizó la cinética de crecimiento de *Escherichia coli* (CPB-8) utilizada en la prueba antimicrobiana.

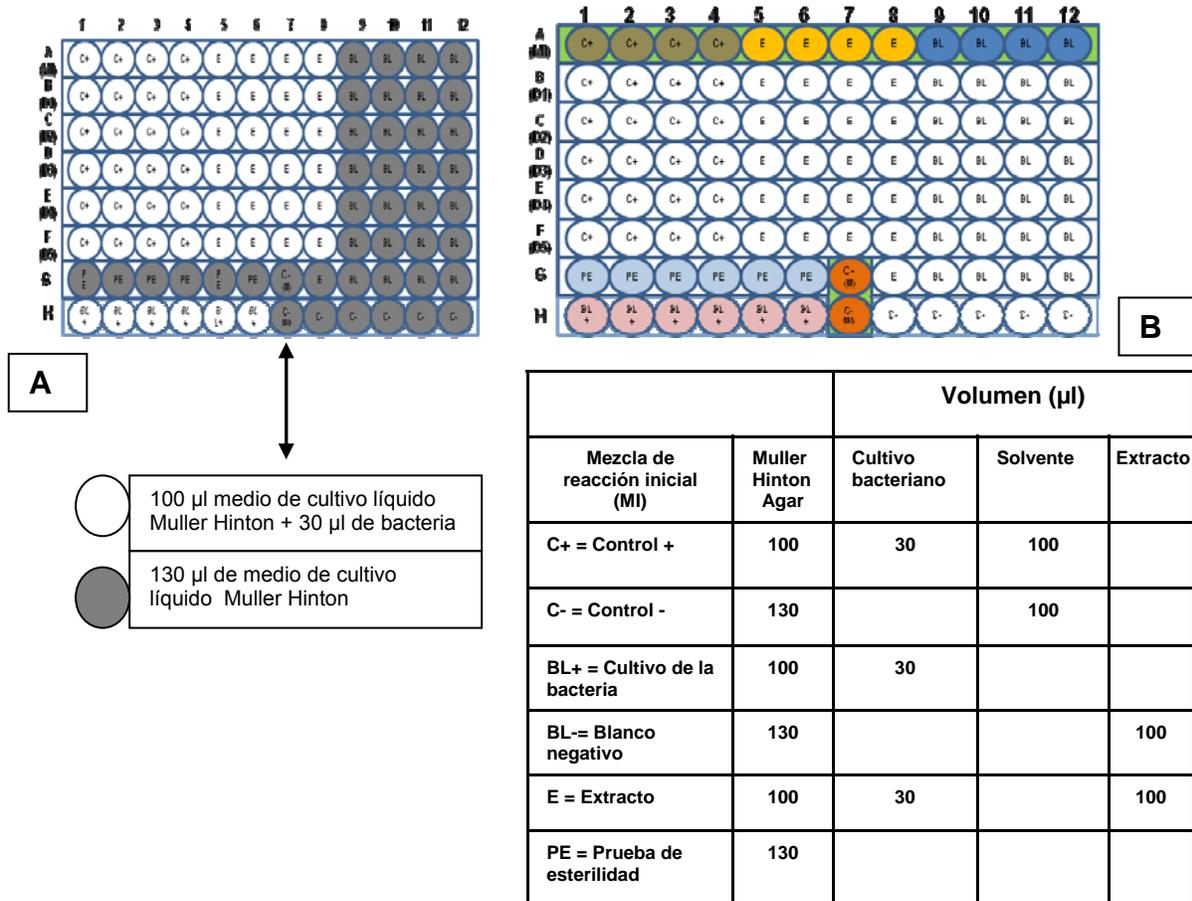
### 5.6.1 Determinación de las propiedades antimicrobianas de las cepas de *Agaricus* spp. (CP-83, CP-89)

Las propiedades antimicrobianas de todos los extractos (excepto ML7 y ML28) de las cepas de *Agaricus* se probaron contra la cepa de *Escherichia coli* (CPB-8), usando el método de microdilución (**Figura 8**), de acuerdo al Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) con el fin de obtener la concentración mínima inhibitoria (CMI) de todos los extractos (**Cuadro 3**), tomando los criterios para determinar la actividad bacteriostática y bactericida que se presenta en la lectura una densidad óptica menor al 20% y del 80% respectivamente de las pruebas en relación a su propio testigo.

## **Preparación de la microplaca**

### *a. Distribución*

Todas las pruebas se realizaron en microplacas estériles en forma de “U” de 96 pozos (Vacutest, Kima). A los pozos de las columnas 1 a la 8 y de la fila A la F, así como la fila H de la columna 1 a la 6 se les colocaron 100 µl de medio de cultivo líquido Muller Hinton más 30 µl de inóculo bacteriano (volumen 130 µl). Al resto de los pozos se les colocaron 130 µl de medio de cultivo líquido Muller Hinton (**Figura 7A**). Las mezclas iniciales (MI) quedaron distribuidas de la siguiente manera: el control positivo (agua, tequila o alcohol 80:20) se colocó en la fila A a partir de la columna 1 a la 4; la mezcla inicial (MI) para probar los extractos obtenidos, se colocaron en la fila A columna 5 a la 8. La mezcla inicial para el blanco negativo (BL-) que midió el medio de cultivo utilizado y el efecto del extracto, se colocaron en la fila A columna 9 a la 12. Por otro lado, la mezcla inicial del blanco positivo (BL+) se ubicó en la fila H a partir de la columna 1 a la 6. La ubicación de la mezcla inicial para el control negativo (C-) que midió el medio líquido más el efecto del color de los solventes utilizados (agua, tequila, alcohol 80:20) quedaron en la columna 7 fila G y H. Finalmente, para comprobar la esterilidad de las condiciones de incubación se realizó la prueba de esterilidad (PE), que consistió en incubar en la misma placa el medio de cultivo líquido Muller Hinton (fila G columna 1 a la 6) como se muestra en la **Figura 7B**.



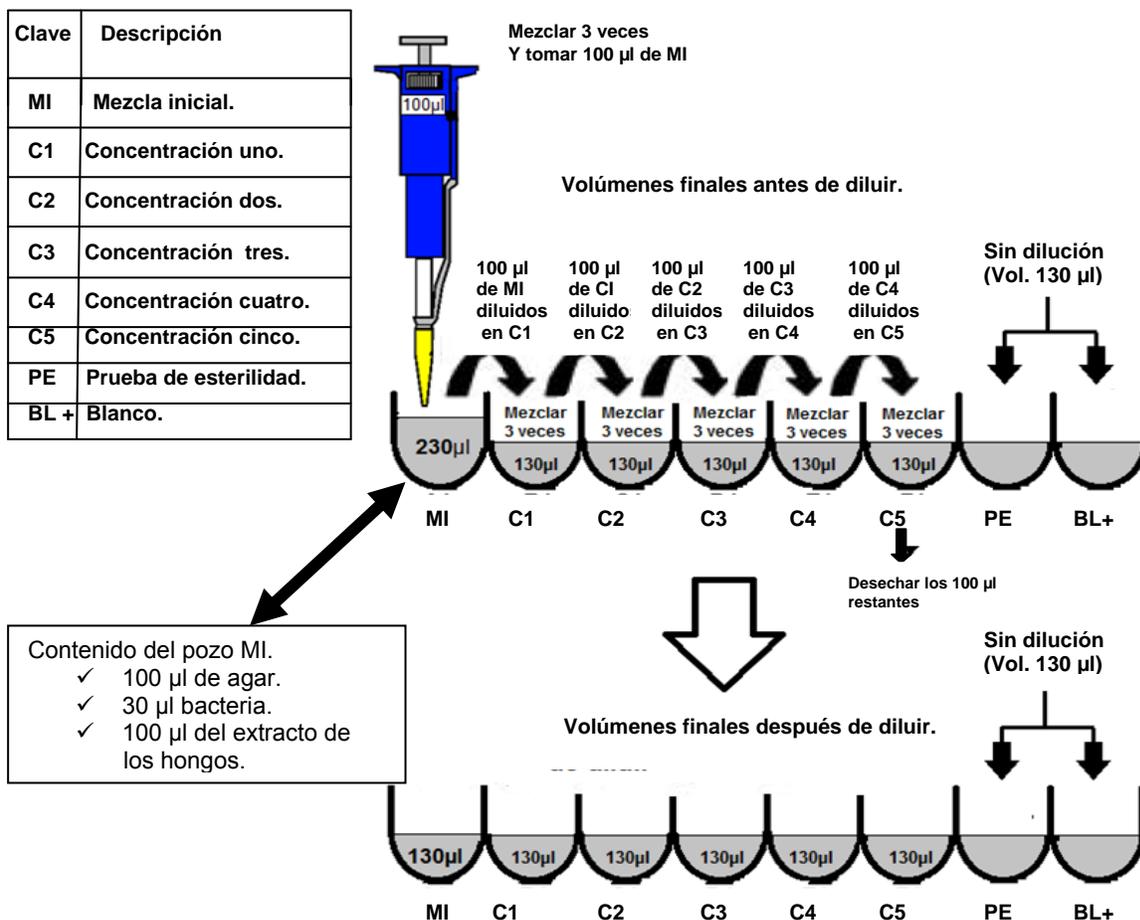
**Figura. 7.** Método de colocación en la microplaca de las muestras para la prueba de determinación antimicrobiana de los extractos de las cepas de *Agaricus*. **A:** distribución de medio cultivo líquido Muller Hinton y bacteria. **B:** distribución del extracto.

### b. Dilución

De las mezclas iniciales se tomaron 100 µl que se transfirieron al siguiente pozo para tener la concentración 1 (C1) y, así sucesivamente hasta el pozo F concentración 5 (C5), tal como muestra en la **Figura 8**. Esta figura muestra la microplaca vista longitudinalmente y el detalle de las diluciones. Al final, a cada pozo, se le agregó un volumen de 130 µl.

### c. Lectura

Después de colocar la última mezcla en cada pozo de la placa con su concentración apropiada se leyó en un espectrofotómetro de microplacas EPOCH (Biotek, USA) a 600 nm.



**Figura 8.** Forma en que se realizó el método de microdilución de acuerdo a Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para calcular la concentración mínima inhibitoria (CMI).

### Incubación de la bacteria y efecto del extracto

Las placas se incubaron a 36°C en una cámara húmeda para evitar la deshidratación de las muestras. La lectura de la placa se realizó a las 24 horas de incubación a 600 nm en un espectrofotómetro de microplacas EPOCH (Biotek, USA). El inculó bacteriano se preparó cada vez que se realizaron las pruebas antimicrobianas a los extractos.

### **Cálculos de la actividad antimicrobiana (AAm)**

El espectrofotómetro EPOCH (Biotek, USA) fue programado para hacer 2 lecturas a cada réplica. Con el promedio de cada lectura, se calculó la actividad antimicrobiana (AAm) con las siguientes ecuaciones:

$$AAm = E - BL - (D.O \text{ del extracto} - D.O. \text{ del blanco} -)$$

$$ES = C+ - C- (D.O \text{ del solvente} - D.O. \text{ del control} -)$$

E= Densidad óptica del medio de cultivo, la bacteria y el extracto.

BL-= Densidad óptica del medio de cultivo y el extracto.

ES= Efecto del solvente.

C+= Densidad óptica del solvente sobre la bacteria.

C-= Densidad óptica del solvente sin bacteria.

El blanco positivo (BL+) sirvió para comparar el crecimiento de la bacteria contra el efecto de los extractos de los hongos.

## **5.7 Determinación de las propiedades antioxidantes**

### **Preparación de los reactivos**

Para realizar la curva de calibración y determinación antioxidantes se prepararon los siguientes reactivos (Soriano *et al.*, 2010): 1) 7.5 g de carbonato de sodio (Sigma, Aldrich) diluidos en 100 mL de agua destilada; 2) 1 mL del reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma, Aldrich) diluido en 10 mL de agua destilada y, 3) 0.01 g de ácido gálico monohidratado (Químico Meyer) se diluyó en 1 mL de etanol, y se aforó a 10 mL con agua destilada. El ácido gálico se usó para realizar la curva de calibración.

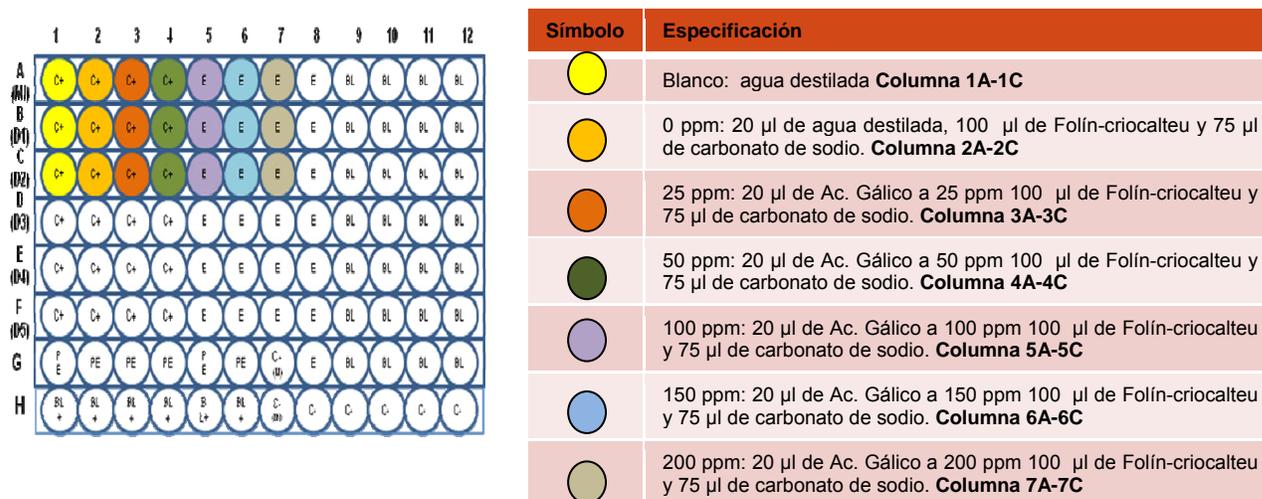
#### **5.7.1 Curva de calibración estándar de ácido gálico**

Para la curva de calibración estándar se prepararon diferentes concentraciones de ácido gálico que fueron de 0 a 200 ppm (**Cuadro 4**). La reacción colorimétrica se realizó en una microplaca de 96 pozos, de la siguiente manera: se colocaron en cada pozo 20 µl de cada una de las diferentes concentraciones de ácido gálico, más 100 µl de Folin-Ciocalteu (diluido 1:10) y 75 µl de la solución de carbonato de sodio (Müller *et al.*, 2010), la curva se realizó por triplicado.

**Cuadro 4.** Concentración de ácido gálico (ppm) utilizadas para la determinación de la curva de calibración de los antioxidantes.

	25	50	100	150	200	ppm
Stock de ácido gálico	250	500	1000	1500	2000	µl
Agua destilada	9.75	9.50	9.0	8.50	8.00	ML

La reacción se incubó a temperatura ambiente en obscuridad por dos horas. Posteriormente, se leyó a 740 nm en un lector de microplacas (Biotek, EPOCH), como blanco se utilizó agua destilada. La **Figura 9** muestra como se colocaron las muestras de la reacción en la microplaca.

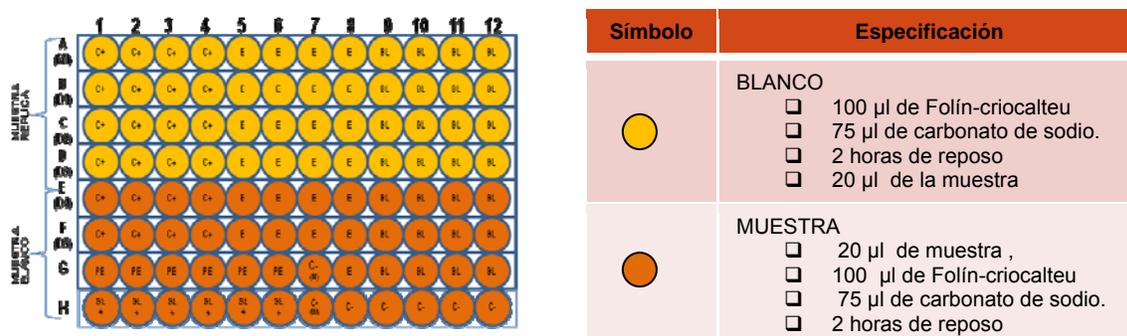


**Figura 9.** Colocación de las muestras en la microplaca para obtener la curva de calibración para determinar los antioxidantes en las cepas de *Agaricus spp.*

### 5.7.2 Determinación de los antioxidantes de las cepas de *Agaricus spp.* (CP-83 y CP-89) por el método de Müller

Después de realizar la curva de calibración, se determinaron los antioxidantes en cada uno de los extractos en estudio de la siguiente forma: en una microplaca de 96 pozos en forma de “U” (Vacutest, Kima) se colocaron 100 µl del reactivo Folin-Ciocalteu, 75 µl de carbonato de sodio y 20 µl de los extractos obtenidos, incubando la reacción por dos horas en condición obscuridad. En el blanco los extractos (20 µl) se colocaron en la microplaca después de haber transcurrido las dos horas de incubación como lo indica la técnica de Mueller *et al.* (2010),

leyéndose a 740 nm La **Figura 10**, muestra como se colocaron los extractos de cada tratamiento, realizando cuatro réplicas por extracto.



**Figura 10.** Método de colocación de las muestras en la microplaca para realizar la lectura de antioxidantes para cada uno de los extractos de las cepas de *Agaricus* spp.

### Cálculo para la determinación de antioxidantes (Ax)

La concentración de los antioxidantes en los extractos se expresaron como microgramos de ácido gálico producido por mililitros de sustrato conforme a la siguiente fórmula:

$$\text{mg AG en 100 mL} = [(A/100000)(1000)] * 100$$

$$\text{mg AG/ g de muestra} = \frac{[(A/100000)(1000)] * 100}{2}$$

Donde A es la absorbancia obtenida de los extractos. AG= Ácido gálico.

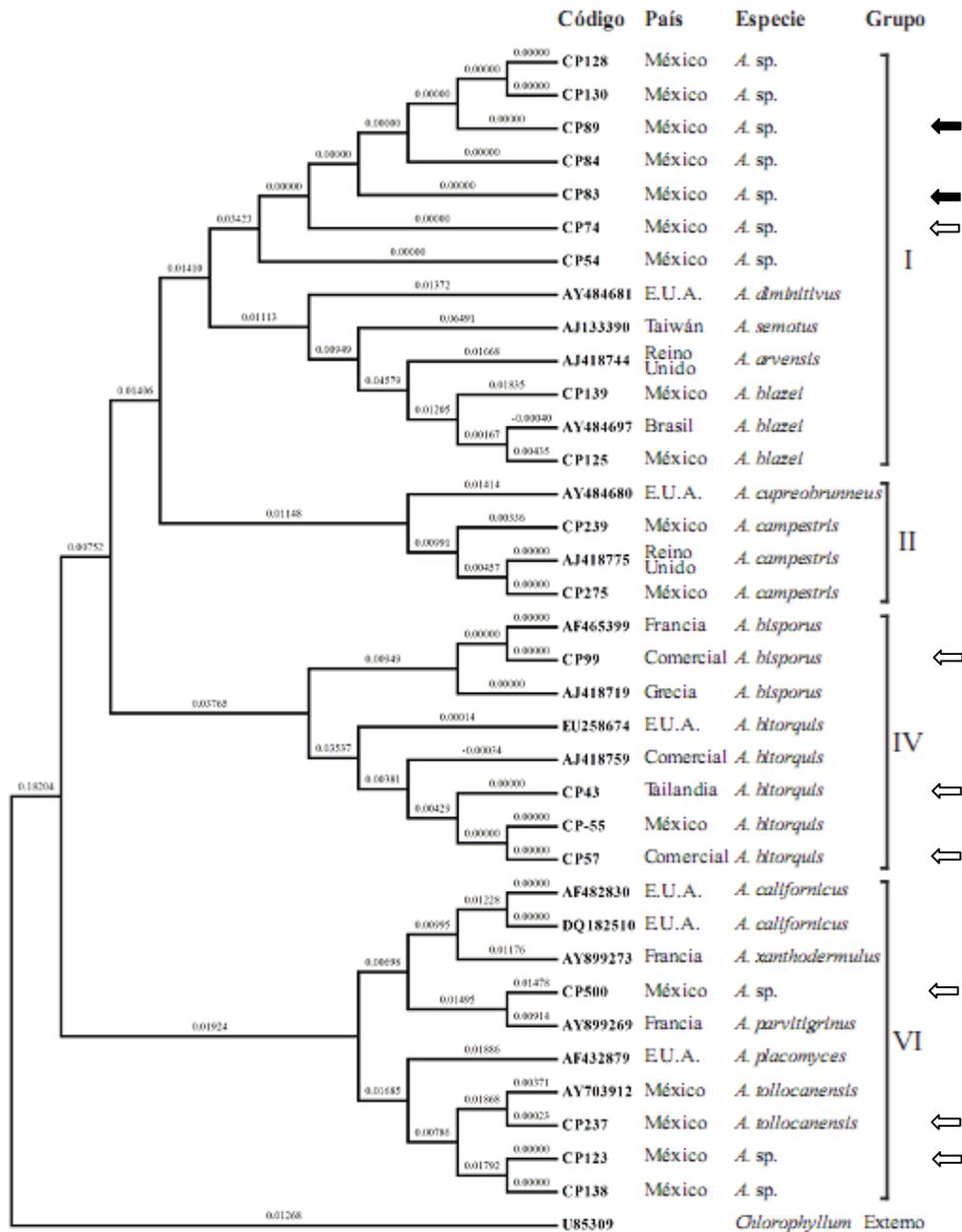
## VI. RESULTADO Y DISCUSIÓN

De las 15 cepas de *Agaricus* seleccionadas, 13 cepas se descartaron debido a su lento crecimiento y poca producción de biomasa (**Anexo 8**). Por lo que se trabajó únicamente con las cepas CP-83 procedente de Valsequillo, Puebla y la CP-89 del Estado de Chiapas, ya que mostraron un rápido crecimiento y biomasa suficiente para realizar la presente investigación.

### 6.1 Determinación de la especie

La evaluación de la variación genética de cepas comerciales de hongos comestibles fue indispensable, ya que es considerada como un requisito primordial para identificar los materiales biológicos dentro del centro de recursos genéticos, CREGENHC (Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles, Funcionales y Medicinales). En el presente trabajo se comparan por primera vez en México las secuencias de la región ITS de diferentes cepas comerciales y silvestres de hongos comestibles del género *Agaricus*. Los resultados han demostrado que las secuencias de la región ITS pueden emplearse para la identificación de hongos comestibles.

Las secuencias en estudio tuvieron alrededor de 640-730 pares de bases, de las cuales se usaron 639 bp para realizar el análisis de reconstrucción de la filogenia de las cepas estudiadas por el método de máxima parsimonia y por el método de *Neighbor-Joining*, con la prueba de *Bootstrap* de 1000 réplicas, empleando una secuencia de *Chlorophyllum* como grupo externo. La **Figura 11**, muestra el dendrograma generado con algunas de las cepas que se utilizaron en el presente trabajo. Tres cepas pertenecen al grupo I (GemL *et al.*, 2004), CP-83, CP-89 y CP-74. Las cepas CP-99, CP-43 y CP-57 pertenecen al grupo IV y la CP-500, CP-237 y CP-123 al grupo VI.



**Figura 11.** Dendrograma de los recursos genéticos nativos de *Agaricus* que se recolectaron en diferentes regiones geográficas de México. Se deriva de una matriz generada en el programa MEGA4, por el método Neighbor-Joining (Tamura *et al.*, 2007), empleando secuencias de la región ITS-ADN y *Chlorophyllum* como grupo externo. Los grupos evolutivos y sus especies corresponden a aquellos reconocidos por Geml *et al.* (2004). El código de las cepas equivale a la clave del CREGENHC, COLPOS, Campus Puebla, ó al número de acceso en el European Bioinformatic Institute, Inglaterra (EBI). Todas las secuencias del ADN están registradas en la base sólida de datos del CREGENHC (Morales *et al.*, 2010). Cepas indicadas con una flecha solida fueron las utilizadas en el presente estudio.

## 6.2 Biomasa producida con agitación (120 rpm) y sin agitación

En el **Cuadro 5**, se muestra la cantidad de biomasa obtenida de las cepas de *Agaricus* CP-83 y CP-89, en las dos condiciones de incubación (con agitación 120 rpm y sin agitación). Como puede apreciarse, las dos cepas produjeron una cantidad de biomasa muy parecida en las dos condiciones de cultivo.

**Cuadro 5.** Cantidad de biomasa seca obtenida de las cepas de *Agaricus* spp. CP-83 y CP-89 en 100 mL de medio de cultivo a los 28 días de incubación (n= 5).

Cepa	Biomasa seca (g)	
	Sin agitación	Agitación (120 rpm)
CP-83	1.01±0.034	1.03±0.01
CP-89	1.09±0.027	1.24±0.02

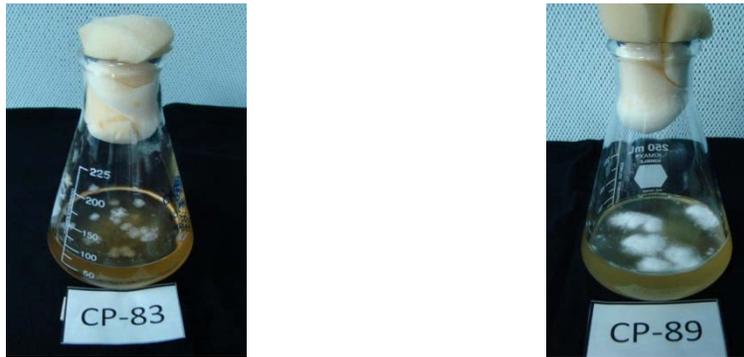
En la **Figura 12**, se muestra el crecimiento del micelio de las cepas CP-89 y CP-83 a 120 rpm. En ambas cepas se formaron pellets que van de 0.5 cm - 3 cm de diámetro y produjeron cantidades similares de biomasa en base al peso seco bajo condiciones de agitación. La CP-89 obtuvo 1.24±0.02 g de biomasa seca en 100 mL de medio de cultivo CYM líquido (n= 5), mientras que, la cepa CP-83 produjo 1.03±0.01 g, los micelios se cosecharon a los 28 días de incubación.



**Figura 12.** Crecimiento micelial de las cepas de *Agaricus* spp. (CP-83 y CP-89) incubadas durante 28 días a temperatura ambiente con agitación a 120 rpm.

Por otro lado, el crecimiento del micelio sin agitación creció tanto en la superficie como sumergido en el medio de cultivo, y fue abundante para la cepa CP-89. Esta cepa tuvo también un abundante crecimiento micelial superficial en comparación de la CP-83 que tuvo el mismo comportamiento (**Figura 13**). En relación a la producción de biomasa la CP-89 produjo 1.09±0.027 g en peso seco y la CP-83 produjo 1.01±0.034 g (**Cuadro 5**). Se ha encontrado que casi todos los hongos

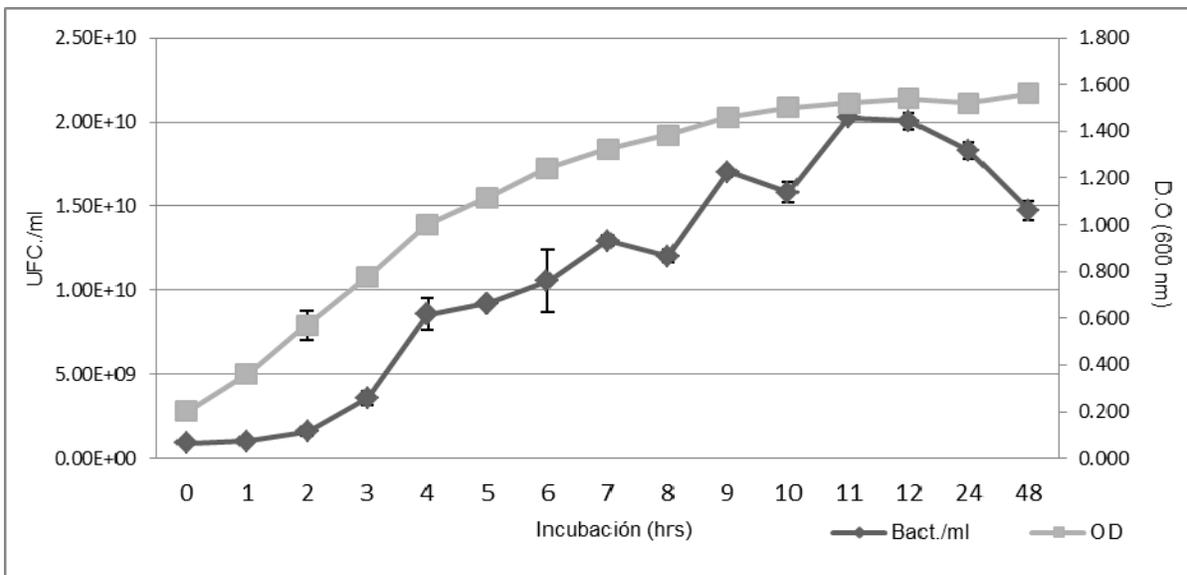
basidiomicetes contienen compuestos activos en los cuerpos fructíferos, micelio o en el medio de cultivo donde se crecen (Wasser, 2002). Sin embargo, el uso del micelio tiene la ventaja de que se producen en menos tiempo, la que crece rápidamente en el medio de cultivo.



**Figura 13.** Crecimiento micelial de las cepas de *Agaricus* spp. (CP-83 y CP-89) sin agitación a los 28 días de crecimiento.

### 6.3 Cinética de crecimiento de la bacteria CPB-8 (*E. coli*)

En la **Figura 14**, se muestra la curva de crecimiento de la bacteria de *E. coli*, usando la densidad óptica (O.D) y las unidades formadoras de colonias (UFC) como puede apreciarse hay relación entre las dos lecturas siendo la densidad óptica la que muestra una tendencia más constante.



**Figura 14.** Cinética de crecimiento de la bacteria *Escherichia coli* (CPB-8) utilizada para evaluar las propiedades antimicrobianas de los extractos de *Agaricus* spp.

## 6.4 Pruebas antimicrobianas

Para realizar la prueba antimicrobiana se utilizaron todos los extractos descritos en el **Cuadro 3** de las cepas CP-83 y CP-89 de *Agaricus* spp. contra la cepa bacteriana CPB-8 de *Escherichia coli* (ATCC 25922).

### 6.4.1 Cepa CP-83 de *Agaricus* spp.

#### Efecto de los macerados

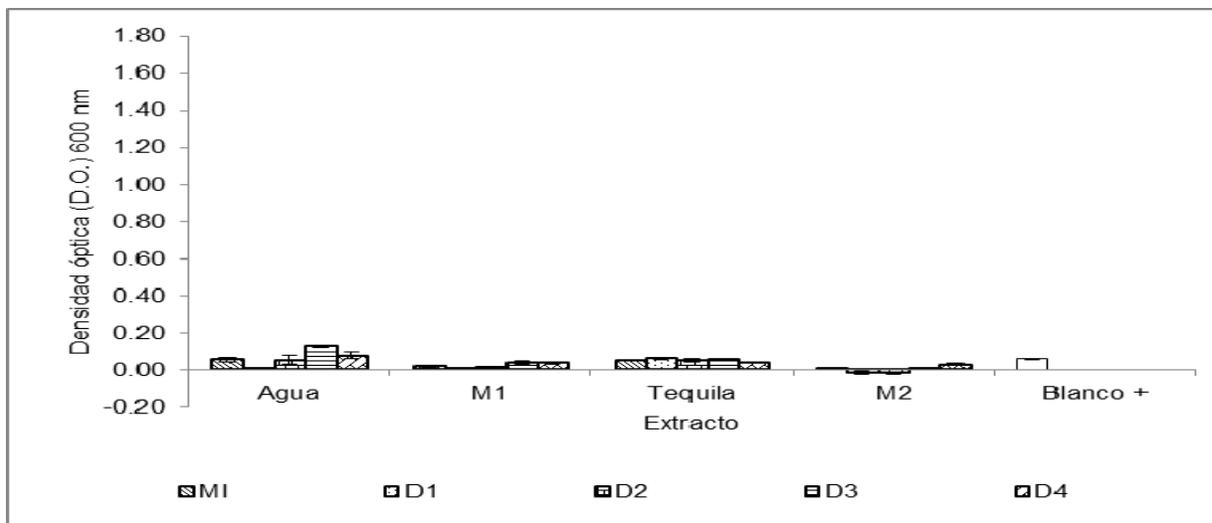
El **Cuadro 6**, muestra la densidad óptica obtenida al tiempo cero ( $t_0$ ) en la cinética bacteriana de *Escherichia coli* y el efecto antimicrobiano de los macerados utilizando como solventes agua (M1) y tequila (M2), donde se observa que no hubo una actividad significativa de la bacteria en comparación con el blanco positivo (BL+).

**Cuadro 6.** Lecturas obtenidas al tiempo cero ( $t_0$ ) de la bacteria de *E. coli* (CPB-8), usada para medir el efecto antimicrobiano de los macerados obtenidos del micelio de la CP-83 de *Agaricus* spp.

Clave del extracto	Agua	M1	Tequila	M2	Blanco +
MI	0.055± 0.011	0.019± 0.005	0.053± 0.003	0.008± 0.006	0.060±0.003
C1	0.010± 0.002	0.008± 0.001	0.065± 0.006	-0.016± 0.008	
C2	0.055± 0.026	0.018± 0.002	0.053± 0.007	-0.018± 0.005	
C3	0.124± 0.003	0.041± 0.011	0.057± 0.007	0.002± 0.005	
C4	0.080± 0.018	0.038± 0.004	0.042± 0.000	0.029± 0.006	

MI= Muestra inicial. C1= Concentración 1. C2= Concentración 2. C3= Concentración 3. C4= Concentración 4.

La **Figura 15**, muestra los resultados de manera gráfica del efecto antimicrobiano de los macerados de la cepa CP-83 contra la bacteria CPB-8 de *Escherichia coli*, corroborando que no hubo una actividad de la bacteria a tiempo cero ( $t_0$ ) en comparación con el blanco positivo (BL+) que tuvo una lectura de 0.060±0.003, también se observa el efecto de los macerados M1 y M2 en el crecimiento bacteriano, con valores de 0.016 a 0.038.



MI= Muestra inicial. C1= Concentración 1. C2= Concentración 2. C3= Concentración 3. C4= Concentración 4.

**Figura 15.** Lecturas obtenidas a tiempo cero ( $t_0$ ), con el lector de microplacas EPOCH (Biotek, USA) para la determinación del efecto antimicrobiano de los macerados (M1 y M2) obtenidos del micelio de la CP-83 de *Agaricus* spp. contra la bacteria de *E. coli* (CPB-8).

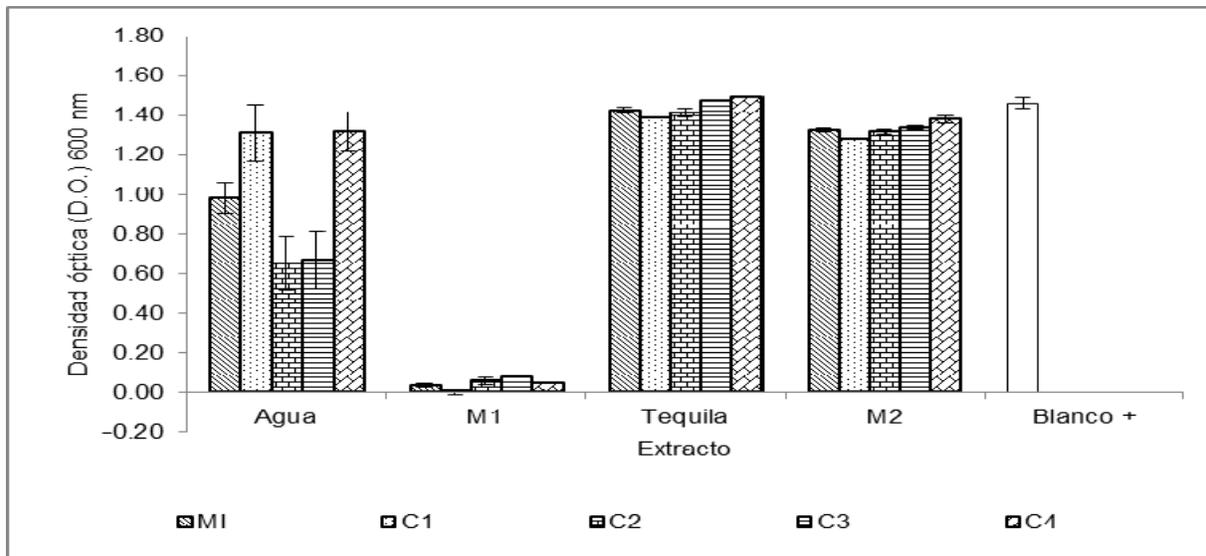
En la lectura realizada al tiempo 24 ( $t_{24}$ ) se ve un crecimiento de la actividad bacteriana en comparación del tiempo cero ( $t_0$ ), en macerado obtenido en agua y resuspendido en agua (M1) se obtuvieron las menores densidades ópticas las cuales variaron de 0.001 a 0.079. Estos resultados mostraron que el macerado de agua resuspendido posee un efecto inhibitorio en el crecimiento de *E. coli*, ya que los valores de la lectura son muy similares a los obtenidos en el  $t_0$ . Por otro lado, la actividad antibacteriana del macerado de tequila resuspendido en tequila (M2) presentó valores de densidad óptica de 1.284 a 1.380, los cuales son muy similares a del blanco positivo, cuyo valor de densidad óptica fue de 1.46 (**cuadro 7**).

**Cuadro 7.** Lecturas obtenidas a las 24 hrs ( $t_{24}$ ) después de inocular la bacteria *E. coli* (CPB-8), con el lector de microplacas EPOCH (Botek, USA) usada para medir el efecto antimicrobiano de los macerados realizados a partir del micelio de la CP-83 de *Agaricus* spp.

Clave del extracto	Agua	M1	Tequila	M2	Blanco +
MI	0.983±0.079	0.031±0.009	0.908±0.041	1.324±0.009	1.46± 0.03
C1	1.311±0.142	0.001±0.011	0.802±0.005	1.284±0.003	
C2	0.650±0.133	0.057±0.018	0.809±0.005	1.317±0.012	
C3	0.670±0.144	0.079±0.007	0.805±0.005	1.336±0.009	
C4	1.318±0.102	0.045±0.002	0.868±0.016	1.380±0.021	

MI= Muestra inicial. C1= Concentración 1. C2= Concentración 2. C3= Concentración 3. C4= Concentración 4.

La **Figura 16**, muestra de manera gráfica los datos del **Cuadro 7**, en donde se observa el efecto obtenido del macerado obtenido en agua y resuspendido en agua sobre el crecimiento de *Escherichia coli*. Se puede observar claramente la inhibición del crecimiento de la bacteria en todas las concentraciones. Si se restan los valores obtenidos de la lectura a las 24 hrs a las del  $t_0$  se tendría una inhibición del 100%.



MI= Muestra inicial. C1= Concentración 1. C2= Concentración 2. C3= Concentración 3. C4= Concentración 4.

**Figura 16** Lecturas obtenidas a las 24 hrs ( $t_{24}$ ), con el lector de microplacas EPOCH (Biotek, USA) para la determinación del efecto antimicrobiano de los macerados obtenidos del micelio de la CP-83 de *Agaricus* spp. contra la bacteria de *E. coli* (CPB-8).

## Efecto de los extractos acuosos

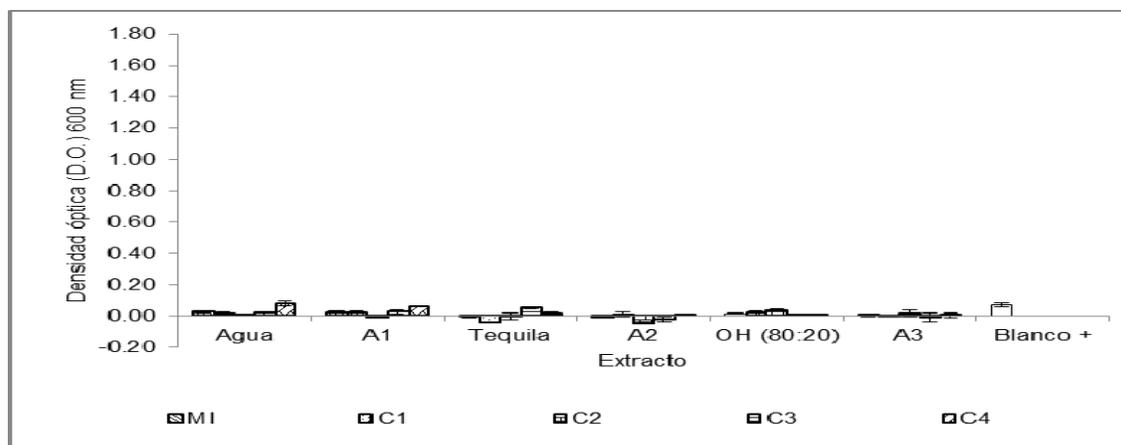
El **Cuadro 8** muestra la densidad óptica obtenida al tiempo cero ( $t_0$ ) de la bacteria de *Escherichia coli* usadas para demostrar las propiedades antimicrobianas de los extractos acuosos obtenidos a partir del micelio de la cepa CP-83 de *Agaricus* spp., utilizando como solventes agua (A1), tequila (A2) y alcohol (A3). Todos los valores observados a este tiempo fueron menores que el blanco + (crecimiento bacteriano). También se observa que la concentración 4 (C4), alcanzó valores similares en el BL+ ya que fue el extracto más diluido.

**Cuadro 8.** Lecturas obtenidas al tiempo cero ( $t_0$ ) de la bacteria de *E. coli* (CPB-8), usada para medir el efecto antimicrobiano de los extractos acuosos realizados a partir del micelio de la CP-83 de *Agaricus* spp.

CE	Agua	A1	Tequila	A2	OH(80:20)	A3	Blanco +
MI	0.026±0.007	0.024±0.006	-0.003±0.009	-0.008±0.006	0.013±0.004	0.004±0.008	0.070±0.013
C1	0.017 ±0.008	0.019 ±0.011	-0.041±0.001	0.009 ±0.015	0.020 ±0.011	-0.002±0.001	
C2	0.007 ±0.006	-0.008±0.002	-0.005±0.023	-0.045±0.005	0.035 ±0.011	0.014 ±0.021	
C3	0.018 ±0.010	0.027 ±0.012	0.052 ±0.006	-0.020±0.015	0.007 ±0.002	-0.008±0.030	
C4	0.078 ±0.017	0.059 ±0.006	0.017 ±0.006	0.006 ±0.001	0.004 ±0.000	0.004 ±0.015	

CE= Clave del extracto. MI= Muestra inicial. C1= Concentración 1. C2= Concentración 2. C3= Concentración 3. C4= Concentración 4.

La **Figura 17**, muestra gráficamente la densidad óptica obtenida al tiempo cero ( $t_0$ ) de la bacteria *E. coli* con los extractos acuosos (A1, A2 y A3) de la cepa CP-83. Se puede apreciar que no hubo actividad de la bacteria a tiempo cero ( $t_0$ ) en comparación con el blanco positivo (BL+), el cual obtuvo una lectura de  $0.070\pm 0.013$ .



MI= Muestra inicial. C1= Concentración 1. C2= Concentración 2. C3= Concentración 3. C4= Concentración 4.

**Figura 17.** Lecturas obtenidas al tiempo cero ( $t_0$ ), con el lector de microplacas EPOCH (Biotek, USA) para la determinación del efecto antimicrobiano en los extractos acuosos obtenidos del micelio de la CP-83 de *Agaricus* spp. contra la bacteria de *E. coli* (CPB-8).

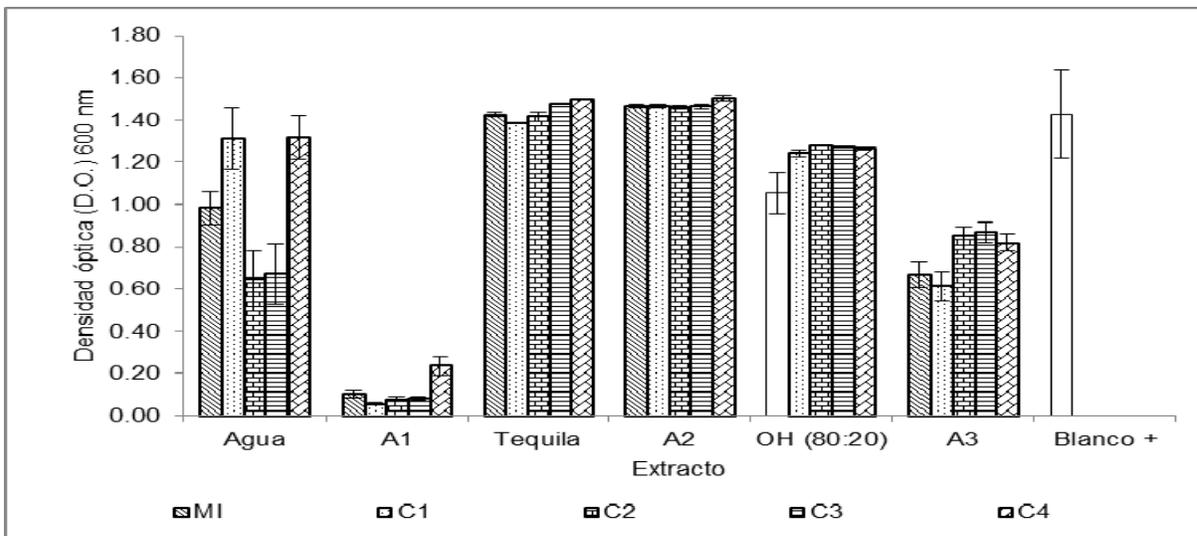
El **Cuadro 9**, muestra las lecturas obtenidas a las 24 hrs ( $t_{24}$ ) de los extractos acuosos resuspendidos en agua (A1), tequila (A2) y alcohol 80:20 (A3). El extracto acuoso resuspendido en agua (A1), fue donde se observó un mayor efecto sobre el crecimiento bacteriano, ya que se obtuvieron valores de densidad óptica de 0.55-0.237, lo que presenta un efecto sobre el crecimiento del 83.5-94.6%. Por otro lado, el extracto acuoso resuspendido en tequila (A2) mientras que el no presentó ningún efecto sobre el crecimiento de *E. coli* y el extracto acuoso resuspendido en alcohol 80:20 (A3) presentó un efecto de aproximadamente el 50% sobre el crecimiento de la bacteria.

**Cuadro 9.** Lecturas obtenidas a las 24 hrs ( $t_{24}$ ) de la bacteria de *E. coli* (CPB-8), usada para medir el efecto antimicrobiano de los extractos acuosos realizados a partir del micelio de la CP-83 de *Agaricus* spp.

CE	Agua	A1	Tequila	A2	OH(80:20)	A3	Blanco +
MI	0.145±0.005	0.104±0.017	1.426±0.013	1.463±0.007	0.876±0.084	0.666±0.062	1.43±0.21
C1	0.131±0.005	0.055±0.004	1.386±0.002	1.464±0.008	0.909±0.066	0.612±0.067	
C2	0.118±0.002	0.077±0.010	1.416±0.023	1.458±0.010	1.070±0.026	0.851±0.43	
C3	0.139±0.008	0.080±0.009	1.476±0.003	1.461±0.010	1.109±0.029	0.868±0.050	
C4	0.153±0.000	0.237±0.044	1.497±0.002	1.503±0.015	1.102±0.021	0.818±0.039	

CE= Clave del extracto. MI= Muestra inicial. C1= Concentración 1. C2= Concentración 2. C3= Concentración 3. C4= Concentración 4.

La **Figura 18**, muestra de manera gráfica el efecto antimicrobiano de los extractos acuosos de la cepa CP-83 contra la bacteria *Escherichia coli*, se puede apreciar que los extractos resuspendidos en agua (A1) lograron un mayor efecto sobre el crecimiento de la bacteria de *E. coli*, esta disminución en el crecimiento representa una inhibición del 83.5-94.6%. Por lo contrario, el extracto resuspendido en tequila (A2) no mostró efecto en el crecimiento de la bacteria, por último, los extractos resuspendidos en alcohol 80:20 (A3), mostraron un efecto de aproximadamente 50% sobre el crecimiento de la bacteria en comparación con el blanco positivo (BL+).



MI= Muestra inicial. C1= Concentración 1. C2= Concentración 2. C3= Concentración 3. C4= Concentración 4.

**Figura 18.** Lecturas obtenidas a las 24 hrs ( $t_{24}$ ), con el lector de microplacas EPOCH (Biotek, USA) para la determinación del efecto antimicrobiano en los extractos acuosos obtenidos del micelio de la CP-83 de *Agaricus* spp. contra la bacteria de *E. coli* (CPB-8).

### Efecto de los extractos etanólicos

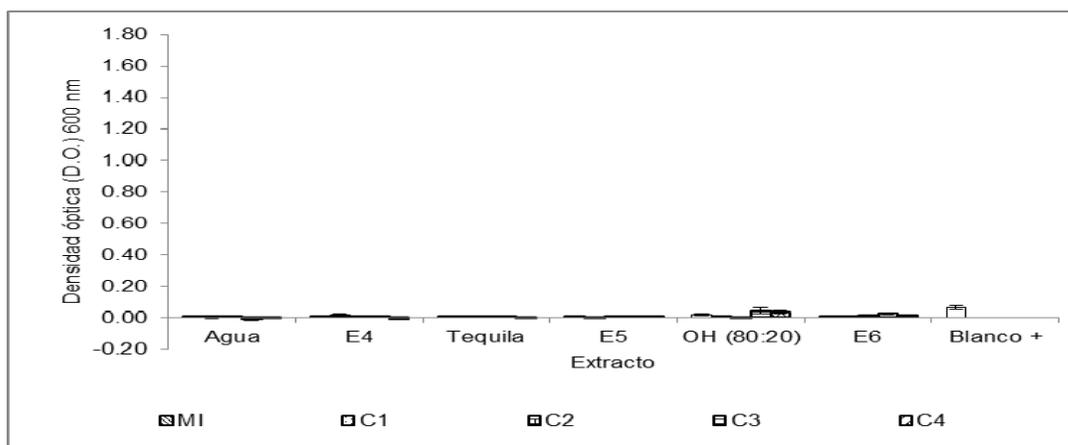
El **Cuadro 10**, muestra la densidad óptica obtenidas al tiempo cero ( $t_0$ ) de la bacteria de *Escherichia coli*; el efecto antimicrobiano junto con los extractos etanólicos de la cepa CP-83 de *Agaricus* spp. En la resuspensión de los extractos se usaron como solventes agua (E4), tequila (E5) y el alcohol 80:20 (E6), se puede observar que no hubo una actividad significativa de la bacteria en comparación al blanco positivo (BL+).

**Cuadro 10.** Lecturas obtenidas al tiempo cero ( $t_0$ ) de la bacteria de *E. coli* (CPB-8), usada para medir el efecto antimicrobiano de los extractos etanólicos realizados a partir del micelio de la CP-83 de *Agaricus* spp.

CE	Agua	E4	Tequila	E5	OH(80:20)	E6	Blanco +
MI	0.002±0.003	0.004±0.002	0.002±0.002	0.003±0.001	0.018±0.005	0.008±0.003	0.060±0.013
C1	0.000±0.004	0.015±0.007	0.002±0.004	-0.003±0.002	0.004±0.001	0.006±0.002	
C2	0.006±0.004	0.001±0.004	0.010±0.001	0.008±0.005	-0.001±0.002	0.012±0.001	
C3	-0.013±0.004	0.004±0.004	0.008±0.002	0.004±0.002	0.041±0.019	0.024±0.005	
C4	0.000±0.004	-0.008±0.000	-0.002±0.001	0.000±0.000	0.036±0.009	0.012±0.004	

CE= Clave del extracto. MI= Muestra inicial. C1= Concentración 1. C2= Concentración 2. C3= Concentración 3. C4= Concentración 4.

La **Figura 19**, muestra de manera gráfica la densidad óptica obtenida a tiempo cero ( $t_0$ ) de la bacteria *E. coli* con los extractos etanólicos (E4, E5 y E6) realizados a partir del micelio de la CP-83 puede apreciarse que no hubo una actividad de la bacteria en comparación con el blanco positivo (BL+) que tuvo una lectura de  $0.006\pm 0.13$ .



MI= Muestra inicial. C1= Concentración 1. C2= Concentración 2. C3= Concentración 3. C4= Concentración 4.

**Figura 19.** Lecturas obtenidas al tiempo cero ( $t_0$ ), con el lector de microplacas EPOCH (Biotek, USA) para la determinación del efecto antimicrobiano en los extractos etanólicos obtenidos del micelio de la CP-83 de *Agaricus* spp. contra la bacteria de *E. coli* (CPB-8).

En el **Cuadro 11**, se muestran los valores de la densidad óptica obtenidos a las 24 hrs ( $t_{24}$ ) del efecto de los extractos etanólicos de la CP-83 de *Agaricus* resuspendidos en agua (E4), tequila (E5) y alcohol 80:20 (E6), usados para inhibir el crecimiento bacteriano de la CPB-8 de *E. coli*. Puede apreciarse que el extracto etanólico resuspendido en agua (E4) tuvo un efecto sobre el crecimiento de la

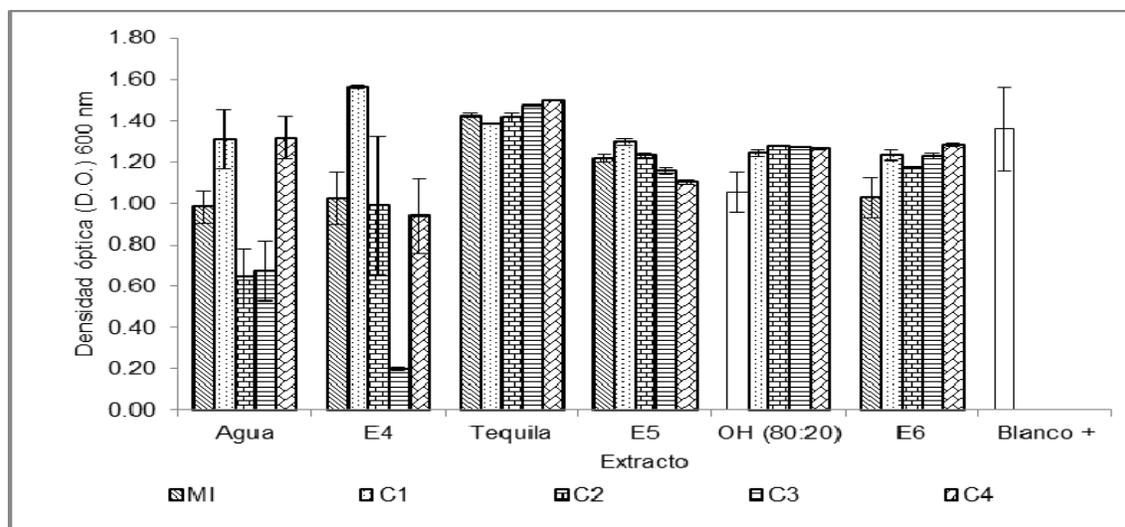
bacteria y que esa disminución representa el 24.7-85.4%; por otro lado, los extractos etanólicos resuspendidos en tequila (E5) y en alcohol (E6) no tuvieron efecto sobre el crecimiento de la bacteria, en comparación con el blanco positivo (BL+) ya que tuvieron una densidad óptica parecida.

**Cuadro 11.** Lecturas obtenidas a las 24 hrs ( $t_{24}$ ) de la bacteria de *E. coli* (CPB-8), usada para medir el efecto antimicrobiano de los extractos etanólicos realizados a partir del micelio de la CP-83 de *Agaricus* spp.

CE	Agua	E4	Tequila	E5	OH(80:20)	E6	Blanco +
MI	0.678±0.092	1.025±0.126	0.928±0.047	1.218±0.018	1.054±0.097	1.029±0.094	1.36±0.20
C1	0.301±0.023	1.565±0.007	0.894±0.113	1.300±0.017	1.244±0.018	1.234±0.023	
C2	0.749±0.313	0.991±0.332	0.816±0.142	1.231±0.011	1.279±0.003	1.176±0.007	
C3	1.091±0.174	0.199±0.008	1.112±0.023	1.158±0.019	1.270±0.001	1.228±0.014	
C4	0.828±0.009	0.939±0.178	1.086±0.003	1.102±0.013	1.265±0.006	1.282±0.009	

CE= Clave del extracto. MI= Muestra inicial. C1= Concentración 1. C2= Concentración 2. C3= Concentración 3. C4= Concentración 4.

En la **Figura 20**, se muestra el efecto de los extractos etanólicos de la CP-83 de *Agaricus* spp. contra la bacteria de *Escherichia coli*. Puede apreciarse que el extracto etanólico resuspendido en agua (E4), tuvo un efecto sobre el crecimiento de la bacteria, ya que presentó valores de densidad óptica de 0.199 a 1.025 lo que indica que influyó en el crecimiento del 24.7-85.4%. Por el contrario, los extractos etanólicos resuspendidos en tequila (E5) y en alcohol 80:20 (E6), no tuvieron efectos en el crecimiento de la bacteria en comparación con el blanco positivo (BL+).



MI= Muestra inicial. C1= Concentración 1. C2= Concentración 2. C3= Concentración 3. C4= Concentración 4.

**Figura 20.** Lecturas obtenidas a las 24 hrs ( $t_{24}$ ), con el lector de microplacas EPOCH (Biotek, USA) para la determinación del efecto antimicrobiano en los extractos etanólicos obtenidos del micelio de la CP-83 de *Agaricus* spp. contra la bacteria de *E. coli* (CPB-8).

#### 6.4.2 Cepa CP-89 de *Agaricus* spp.

##### Efecto de los macerados

El **Cuadro 12**, muestra la densidad óptica obtenida al tiempo cero ( $t_0$ ) en la cinética bacteriana de *Escherichia coli* y el efecto antimicrobiano de los macerados utilizando como solventes agua (M1) y el alcohol 80:20 (M2), se demuestra que no hubo una actividad significativa de la bacteria en comparación al blanco positivo (BL+).

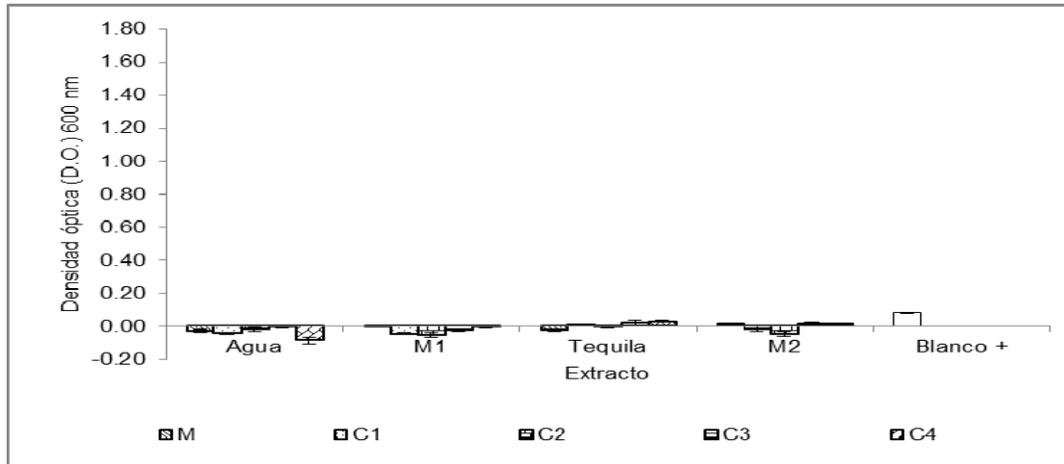
**Cuadro 12.** Lecturas obtenidas al tiempo cero ( $t_0$ ) de la bacteria de *E. coli* (CPB-8), usada para medir el efecto antimicrobiano de los macerados obtenidos del micelio de la CP-89 de *Agaricus* spp.

CE	Agua	M1	Tequila	M2	Blanco +
MI	-0.028±0.007	-0.004±0.005	-0.025±0.007	0.014±0.003	0.079±0.001
C1	-0.044±0.004	-0.045±0.007	0.003±0.000	-0.016±0.016	
C2	-0.019±0.013	-0.052±0.015	-0.006±0.006	-0.045±0.015	
C3	-0.006±0.007	-0.026±0.003	0.018±0.017	0.016±0.010	
C4	-0.087±0.017	-0.004±0.006	0.029±0.005	0.017±0.004	

CE= Clave del extracto. MI= Muestra inicial. C1= Concentración 1. C2= Concentración 2. C3= Concentración 3. C4= Concentración 4.

La **Figura 21**, muestra los resultados de manera gráfica el efecto sobre el crecimiento bacteriano de los macerados de la cepa CP-89 contra la bacteria de

CPB-8 de *Escherichia coli*, mostrando que no hubo una actividad de la bacteria a tiempo cero ( $t_0$ ) en comparación con el blanco positivo (BL+) que tuvo una lectura de  $0.079 \pm 0.001$ .



MI= Concentración 1:1, C1= Concentración 1:2, C2= Concentración 1:3, C3= Concentración 1:4, C4= Concentración 1:5

**Figura 21.** Lecturas obtenidas a tiempo cero ( $t_0$ ), con el lector de microplacas EPOCH (Biotek, USA) para la determinación del efecto antimicrobiano de los macerados (M1 y M2) obtenidos del micelio de la CP-89 de *Agaricus* spp. contra la bacteria de *E. coli* (CPB-8).

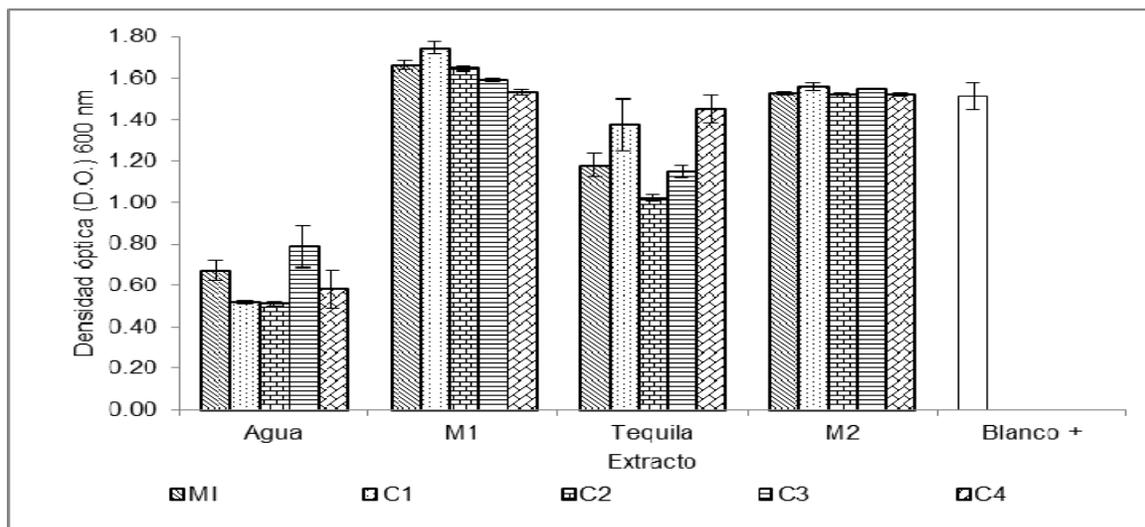
En la lectura realizada al tiempo 24 ( $t_{24}$ ) se ve un crecimiento parecido en casi todas las condiciones de la actividad bacteriana, en comparación del tiempo cero ( $t_0$ ). El macerado obtenido en agua y resuspendido en agua (M1) presentó una densidad óptica de 1.532 a 1.745. Por el contrario, la actividad antimicrobiana del macerado tequila resuspendido en tequila (M2) mostró valores de densidad óptica de 1.518 a 1.560 (**Cuadro 13**).

**Cuadro 13.** Lecturas obtenidas al veinte cuatro ( $t_{24}$ ) de la bacteria de *E. coli* (CPB-8), usada para medir el efecto antimicrobiano de los macerados realizados a partir del micelio de la CP-89 de *Agaricus* spp.

CE	Agua	M1	Tequila	M2	Blanco +
MI	0.672±0.047	1.662±0.022	1.179±0.055	1.523±0.009	1.51±0.06
C1	0.520±0.010	1.745±0.028	1.375±0.125	1.560±0.020	
C2	0.512±0.012	1.646±0.009	1.020±0.017	1.518±0.011	
C3	0.786±0.100	1.592±0.010	1.150±0.031	1.546±0.002	
C4	0.582±0.092	1.532±0.012	1.450±0.065	1.520±0.010	

CE= Clave del extracto. MI= Muestra inicial. C1= Concentración 1. C2= Concentración 2. C3= Concentración 3. C4= Concentración 4.

La **Figura 22**, muestra de manera gráfica los datos del **Cuadro 13**, donde se observa el efecto obtenido de los macerados M1 y M2 sobre el crecimiento de la bacteria CPB-8 de *Escherichia coli*. Puede notarse que el macerado de tequila resuspendido en tequila (M2), mostró una densidad óptica de 1.518 a 1.560 el cual es muy similar al blanco positivo (BL+). Por otro lado, el macerado de agua resuspendido en agua (M1) presentó una densidad óptica de 1.532 a 1.745, lo que representa un estímulo 5.1-15.5% el crecimiento de la bacteria mas que el blanco positivo (BL+).



MI= Muestra inicial. C1= Concentración 1. C2= Concentración 2. C3= Concentración 3. C4= Concentración 4.

**Figura 22.** Lecturas obtenidas a las 24 hrs ( $t_{24}$ ), con el lector de microplacas EPOCH (Biotek, USA) para la determinación del efecto antimicrobiano de los macerados obtenidos del micelio de la CP-89 de *Agaricus* spp. contra la bacteria de *E. coli* (CPB-8).

### Efecto de los extractos acuosos

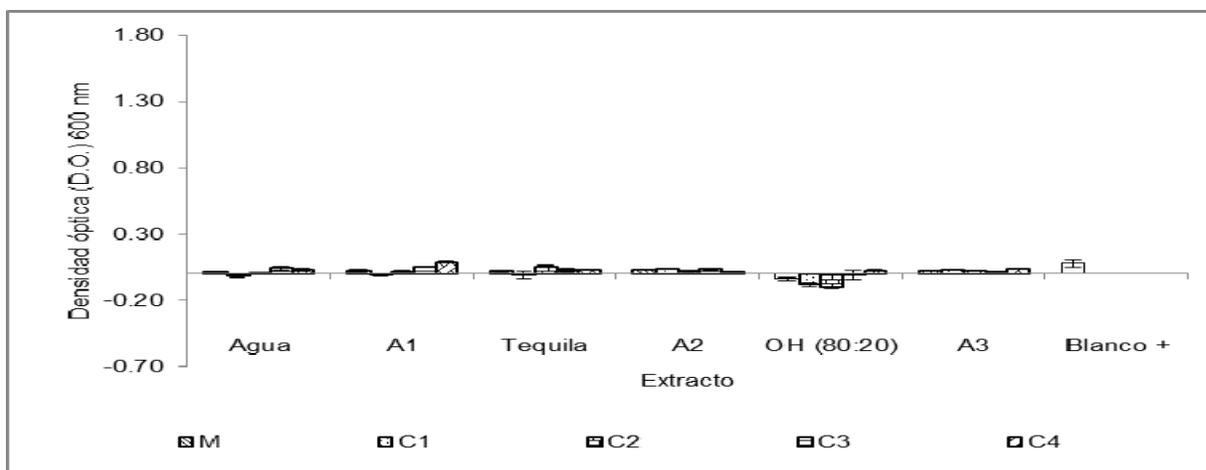
El **Cuadro 14**, muestra la densidad óptica obtenida al tiempo cero ( $t_0$ ) de la bacteria de *Escherichia coli*, usadas para medir el efecto antimicrobiano de los extractos acuosos obtenidos a partir del micelio de la cepa CP-89 de *Agaricus* spp., y utilizando como solventes agua (A1), tequila (A2) y alcohol 80:20 (A3). Todos los valores observados a este tiempo fueron menores que el blanco positivo (BL+).

**Cuadro 14.** Lecturas obtenidas al tiempo cero ( $t_0$ ) de la bacteria de *E. coli* (CPB-8), usada para medir el efecto antimicrobiano de los extractos acuosos realizados a partir del micelio de la CP-89 de *Agaricus* spp.

CE	Agua	A1	Tequila	A2	OH(80:20)	A3	Blanco +
MI	0.011±0.006	0.023±0.010	0.018±0.008	0.025±0.003	-0.039±0.012	0.023±0.003	0.08±0.03
C1	0.021±0.004	0.011±0.007	0.007±0.025	0.037±0.005	-0.083±0.013	0.027±0.003	
C2	0.001±0.003	0.016±0.010	0.056±0.010	0.020±0.007	-0.105±0.007	0.019±0.003	
C3	0.044±0.015	0.051±0.005	0.028±0.016	0.034±0.010	-0.007±0.034	0.017±0.004	
C4	0.031±0.013	0.087±0.008	0.029±0.004	0.016±0.003	0.024±0.008	0.038±0.007	

CE= Clave del extracto. MI= Muestra inicial. C1= Concentración 1. C2= Concentración 2. C3= Concentración 3. C4= Concentración 4.

La **Figura 23**, muestra gráficamente las propiedades antimicrobianas de los extractos acuosos (A1, A2 y A3) de la CP-89 contra la bacteria de CPB-8 de *Escherichia coli*, evidenciando que no hubo actividad de la bacteria a tiempo cero ( $t_0$ ) en comparación con el blanco positivo (BL+) con una lectura de 0.08±0.03.



MI= Muestra inicial. C1= Concentración 1. C2= Concentración 2. C3= Concentración 3. C4= Concentración 4.

**Figura 23.** Lecturas obtenidas al tiempo cero ( $t_0$ ), con el lector de microplacas EPOCH (Biotek, USA) para la determinación del efecto antimicrobiano en los extractos acuosos obtenidos del micelio de la CP-89 de *Agaricus* spp. contra la bacteria de *E. coli* (CPB-8).

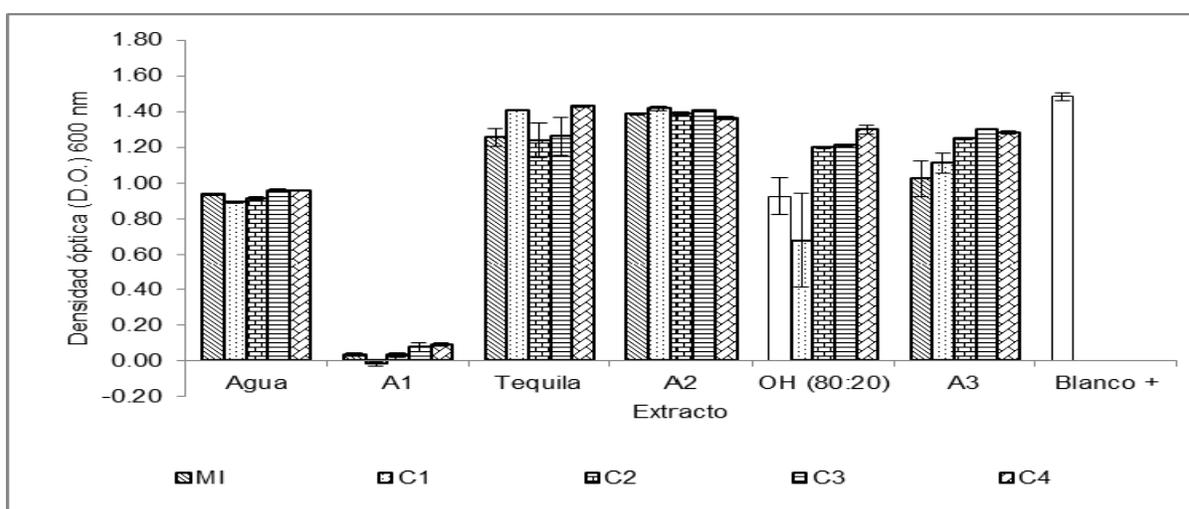
El **Cuadro 15**, muestra las lecturas obtenidas a las 24 hrs de incubación ( $t_{24}$ ) para medir el efecto de los extractos acuosos resuspendidos en agua (A1), tequila (A2) y alcohol 80:20 (A3). Como se muestra en los datos, el mayor efecto sobre el crecimiento bacteriano fue el extracto acuoso resuspendido en agua (A1), con valores de densidad óptica de -0.019 a 0.075, lo que representa un efecto antimicrobiano del 94.9-101.2%. Por el contrario, el extracto acuoso resuspendido en tequila (A2) y extracto acuoso resuspendido en alcohol 80:20 (A3) no mostró un efecto significativo en el crecimiento de la bacteria.

**Cuadro 15.** Lecturas obtenidas a las 24 hrs ( $t_{24}$ ) de la bacteria de *E. coli* (CPB-8), usada para medir el efecto antimicrobiano de los extractos acuosos realizados a partir del micelio de la CP-89 de *Agaricus* spp.

CE	Agua	A1	Tequila	A2	OH(80:20)	A3	Blanco +
MI	0.937±0.006	0.034±0.011	1.255±0.049	1.386±0.006	0.925±0.102	1.024±0.098	1.48±0.02
C1	0.895±0.007	-0.019±0.011	1.406±0.004	1.417±0.014	0.679±0.264	1.112±0.058	
C2	0.915±0.011	0.033±0.013	1.240±0.098	1.387±0.009	1.200±0.007	1.250±0.008	
C3	0.959±0.007	0.075±0.025	1.263±0.106	1.404±0.004	1.212±0.006	1.301±0.005	
C4	0.960±0.003	0.091±0.011	1.430±0.005	1.362±0.008	1.299±0.023	1.284±0.010	

CE= Clave del extracto. MI= Muestra inicial. C1= Concentración 1. C2= Concentración 2. C3= Concentración 3. C4= Concentración 4.

La **figura 24**, muestra de manera gráfica las lecturas obtenidas de la densidad óptica del efecto de los extractos acuosos, sobre el crecimiento de la bacteria de *E. coli* se observó que los extractos resuspendidos en agua (A1) lograron un mayor efecto sobre el crecimiento de la bacteria de *Escherichia coli*, con una inhibición del 100%. Por lo contrario, los extractos resuspendidos en tequila (A2) y resuspendido en alcohol 80:20 (A3) no mostró efecto significativo sobre el crecimiento de la bacteria ya que el crecimiento de la bacteria en estos extractos fue similar al del blanco positivo (BL+).



MI= Muestra inicial. C1= Concentración 1. C2= Concentración 2. C3= Concentración 3. C4= Concentración 4.

**Figura 24.** Lecturas obtenidas a las 24 hrs ( $t_{24}$ ), con el lector de microplacas EPOCH (Biotek, USA) para la determinación del efecto antimicrobiano en los extractos acuosos obtenidos del micelio de la CP-89 de *Agaricus* spp. contra la bacteria de *E. coli* (CPB-8).

### Efecto de los extractos etanólicos

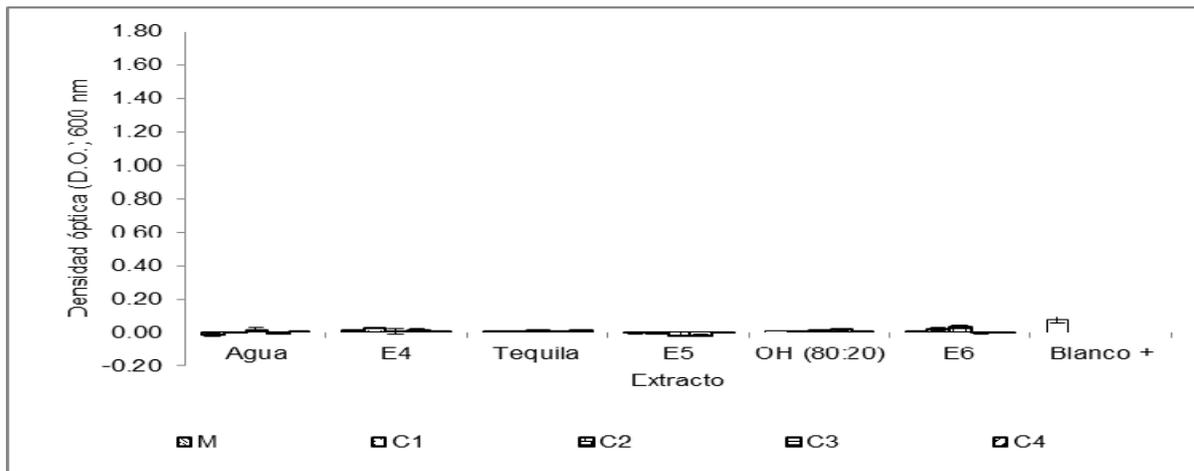
El **Cuadro 16**, muestra la densidad óptica obtenidas al tiempo cero ( $t_0$ ) de la bacteria de *Escherichia coli*; y el efecto antimicrobiano de los extractos etanólicos de la cepa CP-89 de *Agaricus* spp. Se pudo observar que no hubo una actividad significativa de la bacteria en comparación al blanco positivo (BL+).

**Cuadro 16.** Lecturas obtenidas al tiempo cero ( $t_0$ ) de la bacteria de *E. coli* (CPB-8), usada para medir el efecto antimicrobiano de los extractos etanólicos realizados a partir del micelio de la CP-89 de *Agaricus spp.*

CE	Agua	E4	Tequila	E5	OH(80:20)	E6	Blanco +
MI	-0.015±0.008	0.014±0.005	0.009±0.002	-0.007±0.003	0.013±0.001	0.010±0.004	0.074±0.02
C1	-0.001±0.007	0.029±0.003	0.010±0.003	-0.008±0.007	0.011±0.002	0.023±0.008	
C2	0.013±0.015	0.008±0.018	0.015±0.002	-0.020±0.004	0.015±0.001	0.035±0.008	
C3	-0.011±0.003	0.016±0.011	0.009±0.004	-0.020±0.005	0.019±0.005	-0.002±0.007	
C4	0.006±0.004	0.010±0.004	0.012±0.002	-0.001±0.002	0.011±0.001	-0.005±0.004	

CE= Clave del extracto. MI= Muestra inicial. C1= Concentración 1. C2= Concentración 2. C3= Concentración 3. C4= Concentración 4.

La **Figura 25**, muestra las lecturas del efecto antimicrobiano de los extractos etanólicos (E4, E5 y E6) realizados a partir del micelio de la CP-89 contra la bacteria de CPB-8 de *Escherichia coli*, corroborando que no hubo una actividad de la bacteria a tiempo cero ( $t_0$ ) en comparación con el blanco positivo (BL+) que tuvo una lectura 0.074±0.02.



MI= Muestra inicial. C1= Concentración 1. C2= Concentración 2. C3= Concentración 3. C4= Concentración 4.

**Figura 25.** Lecturas obtenidas al tiempo cero ( $t_0$ ), con el lector de microplacas EPOCH (Biotek, USA) para la determinación del efecto antimicrobiano en los extractos etanólicos obtenidos del micelio de la CP-89 de *Agaricus spp.* contra la bacteria de *E. coli* (CPB-8).

En el **Cuadro 17**, se muestran los valores de la densidad óptica obtenidos a las 24 hrs ( $t_{24}$ ) del crecimiento bacteriano los extractos etanólicos a partir del micelio de la CP-89 de *Agaricus* resuspendido en agua (E4), tequila (E5) y alcohol 80:20 (E6). Puede observarse que el extracto etanólico resuspendido en agua (E4)

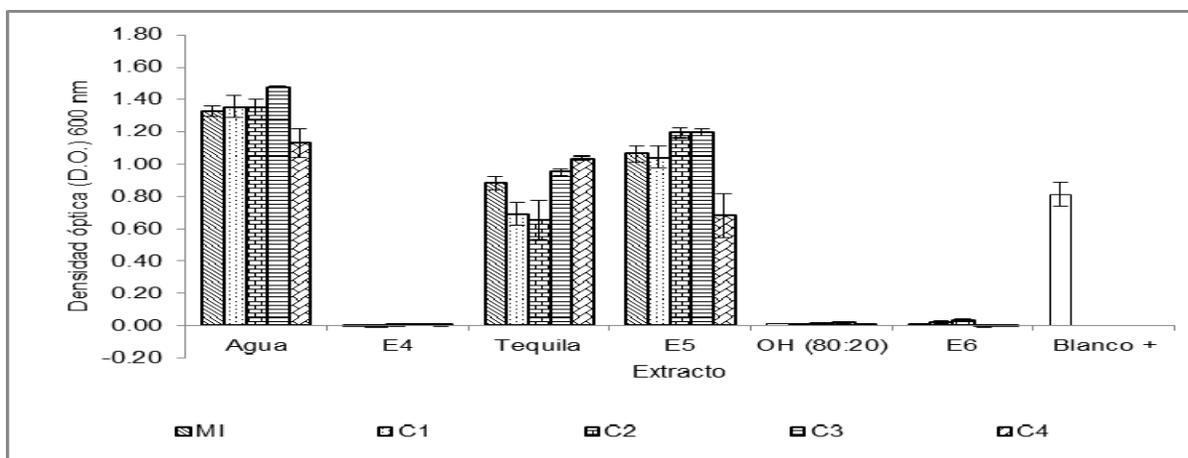
inhibió el crecimiento bacteriano de la CPB-8 de *E. coli*, entre un 99 al 100%. Por otro lado, los extractos etanólicos resuspendidos en tequila (E5) no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento de la bacteria. Sin embargo, en el extracto etanólico no hubo crecimiento ni en el control, ni en el extracto.

**Cuadro 17.** Lecturas obtenidas a las 24 hrs ( $t_{24}$ ) de la bacteria de *E. coli* (CPB-8), usada para medir el efecto antimicrobiano de los extractos etanólicos realizados a partir del micelio de la CP-89 de *Agaricus spp.*

CE	Agua	E4	Tequila	E5	OH(80:20)	E6	Blanco +
MI	1.325±0.034	-0.001±0.002	0.880±0.045	1.061±0.053	0.013±0.001	0.010±0.004	0.812±0.074
C1	1.354±0.069	-0.009±0.005	0.690±0.070	1.040±0.069	0.011±0.002	0.023±0.008	
C2	1.349±0.051	0.001±0.005	0.653±0.123	1.192±0.031	0.015±0.001	0.035±0.008	
C3	1.477±0.006	0.001±0.003	0.951±0.019	1.195±0.024	0.019±0.005	-0.003±0.007	
C4	1.130±0.088	0.002±0.006	1.035±0.014	0.680±0.137	0.011±0.001	-0.005±0.004	

CE= Clave del extracto. MI= Muestra inicial. C1= Concentración 1. C2= Concentración 2. C3= Concentración 3. C4= Concentración 4.

El efecto antimicrobiano del extracto etanólico resuspendido en agua (E4) de la CP-89 de *Agaricus spp.* Sobre la bacteria de *Escherichia coli*, mostró una inhibición en el crecimiento antimicrobiano del 99-100%. Por el contrario, el extracto etanólico resuspendido en tequila (E5) no tuvo efecto el crecimiento bacteriano ya que creció igual que el blanco positivo (BL+) y mientras que en extracto resuspendido en alcohol 80:20 (E6) no hubo crecimiento ni en el control, ni en el extracto (**Figura 26**).

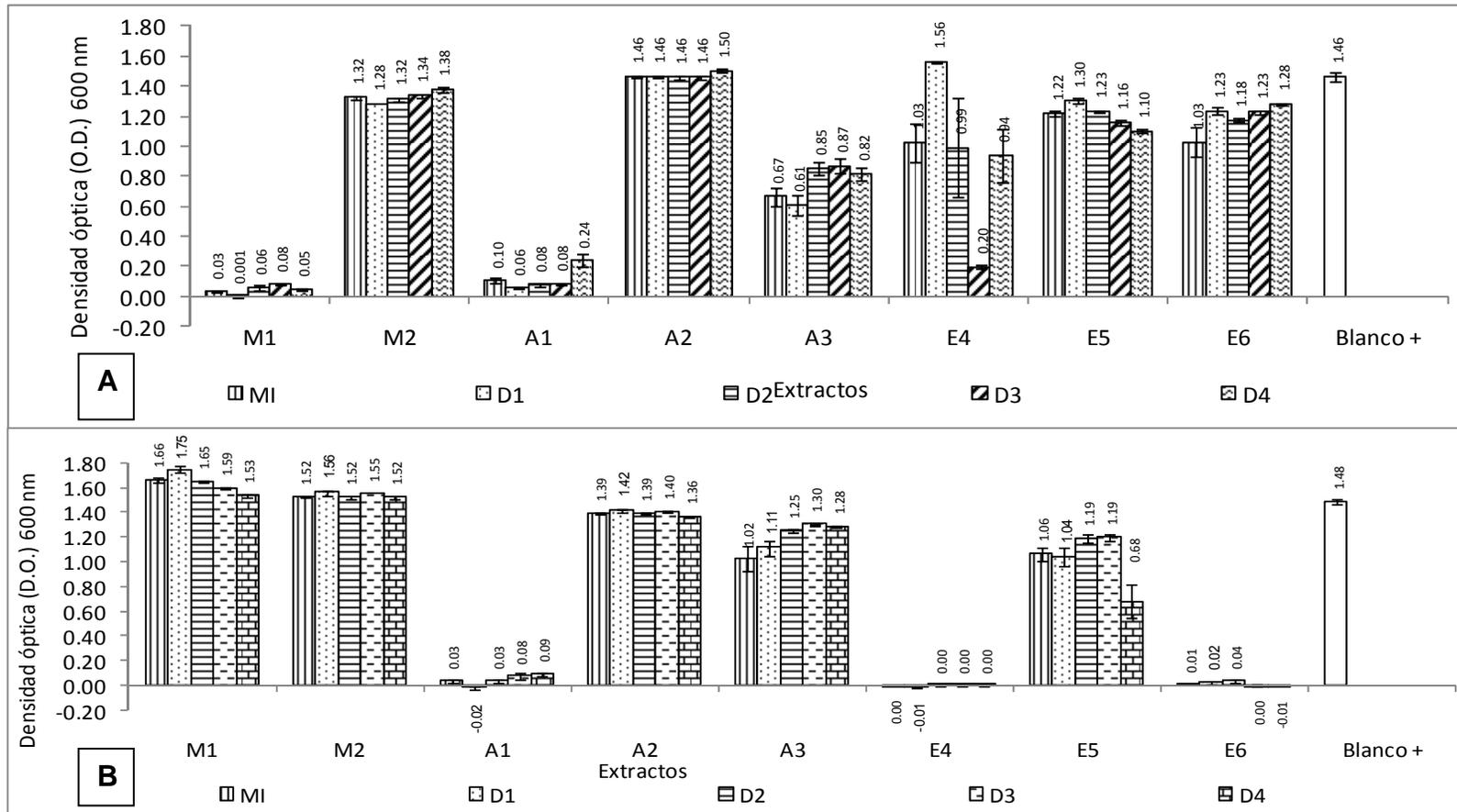


MI= Muestra inicial. C1= Concentración 1. C2= Concentración 2. C3= Concentración 3. C4= Concentración 4.

**Figura 26.** Lecturas obtenidas a las 24 hrs ( $t_{24}$ ), con el lector de microplacas EPOCH (Biotek, USA) para la determinación del efecto antimicrobiano en los extractos etanólicos obtenidos del micelio de la CP-89 de *Agaricus* spp. contra la bacteria de *E. coli* (CPB-8).

### 6.4.3 Comparación del efecto antimicrobiano de las cepas en estudio sobre *E. coli*

En la **Figura 27** se muestra una comparación del efecto antimicrobiano de las cepas CP-83 y CP-89 de *Agaricus* spp. con sus respectivos extracto etanólicos, acuosos y macerados. Como se puede observar la CP-83 tuvo el 95% de inhibición de crecimiento bacteriano en macerado de agua (M1) y extracto de agua resuspendido en agua (A1) (**Figura 27A**). Mientras que en la CP-89 el 95% de efecto en la inhibición del crecimiento bacteriano se observó en el extracto etanólico resuspendido en agua (E4), extracto etanólico resuspendido en alcohol (E6) y en el extracto acuoso resuspendido en agua (A1) (**Figura 27B**). Con los datos anteriores se puede decir que el extracto acuoso resuspendido en agua (A1) mostraron una inhibición del crecimiento bacteriano del 95% en ambas cepas de *Agaricus* spp. (CP-83 y CP89) contra la cepa bacteriana de *Escherichia coli* (CPB-8). Estos resultados son comparables al trabajo realizado por Mehmet *et al.* (2001), quienes estudiaron extractos etanólicos de *Agaricus* contra una cepa de *Escherichia coli* (ATCC35218) los cuales no inhibieron el crecimiento de la bacteria; sin embargo, dichos autores se limitan a trabajar solo con extractos etanólicos sin probar extractos acuosos por otro lado.



MI= Muestra inicial. C1= Concentración 1. C2= Concentración 2. C3= Concentración 3. C4= Concentración 4.

**Figura 27.** Comparación de las lecturas obtenidas a las 24 hrs ( $t_{24}$ ), con el lector de microplacas EPOCH (Biotek, USA) para la determinación del efecto antimicrobiano entre los macerados, extractos acuosos y extractos etanólicos realizados a partir del micelio de las cepas CP-83 (A) y CP-89 (B) de *Agaricus* spp. contra la bacteria de *E. coli*.

#### 6.4.4 Concentración mínima inhibitoria de los extractos miceliales

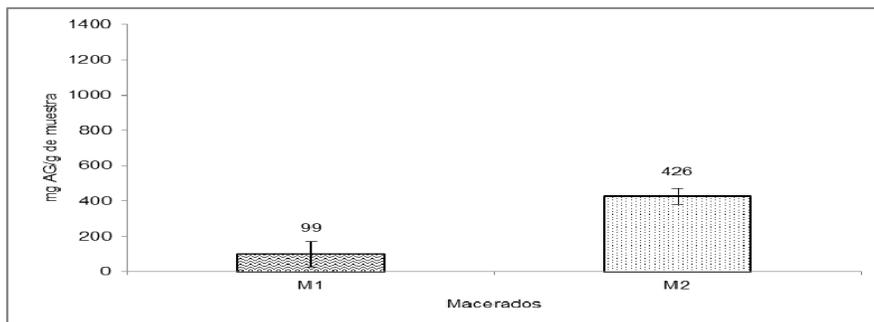
El efecto de la concentración mínima inhibitoria en el extracto acuoso resuspendido en agua (A3) de la CP-89 se localizó en la muestra inicial (MI) y en la concentración 1 (C1), mientras que en la cepa CP-83 la concentración mínima inhibitoria se encontró en el extracto etanólico resuspendido en alcohol 80:20 (E6) en la muestra inicial (MI).

#### 6.5 Determinación de antioxidantes

##### 6.5.1 CP-83 de *Agaricus* spp.

##### Antioxidantes de los macerados

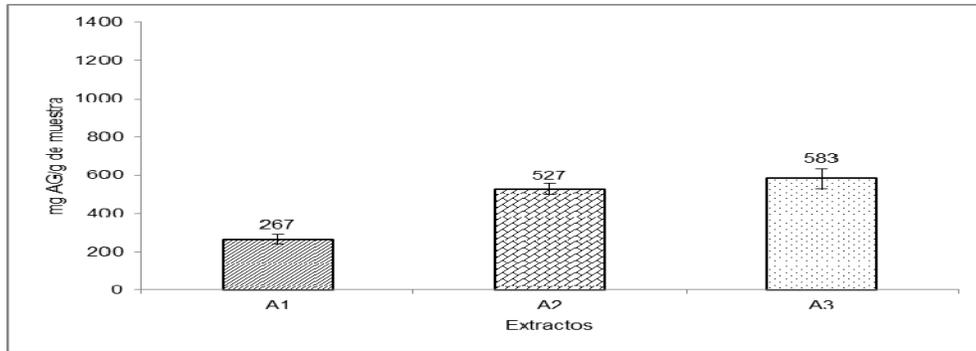
La **Figura 28**, muestra la cantidad de antioxidantes de los macerados (M1 y M2) de la cepa CP-83. Puede notarse que el macerado en tequila (M2) presentó la concentración más alta con 426 mg AG/g de muestra, mientras que el macerado de agua presentó una concentración de 99 mg AG/g de muestra.



**Figura 28.** Cantidad de antioxidantes de los macerados obtenidos en agua (M1) y en tequila (M2) obtenido del micelio de la cepa CP-83 de micelio de *Agaricus* spp. a los 28 días de incubación.

##### Antioxidantes de los extractos acuosos

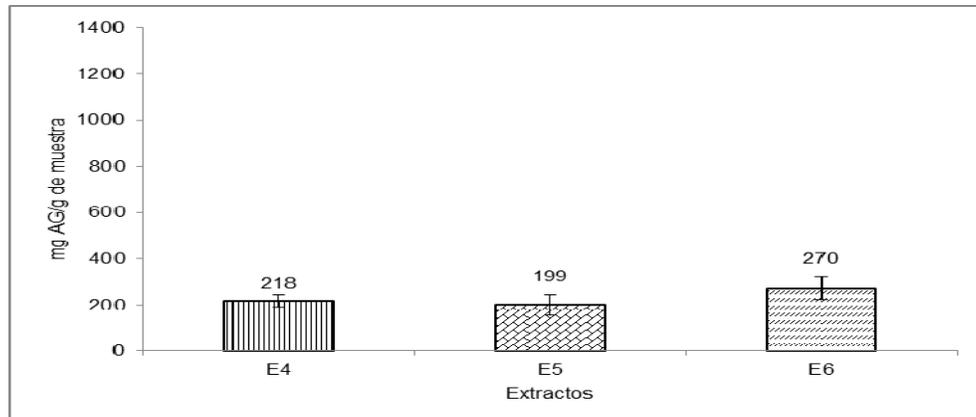
En los extractos acuosos, el extracto resuspendido en alcohol 80:20 (A3) presentó una concentración de 583 mg AG/g de muestra lo cual demostró tener mayor concentración en propiedades antioxidantes, ya que el extracto acuosos resuspendido en tequila (A2) tuvo una concentración de 527 mg AG/g de muestra y el extracto acuoso resuspendido en agua (A1) solo alcanzó la concentración de 267 mg AG/g de muestra (**Figura 29**).



**Figura 29.** Cantidad de antioxidantes de los extractos acuosos obtenidos en agua (A1), en tequila (A2) y en alcohol 80:20 (A3) obtenido del micelio de la cepa CP-8 3 de *Agaricus* spp. a los 28 días de incubación.

### Cantidad de los extractos etanólicos

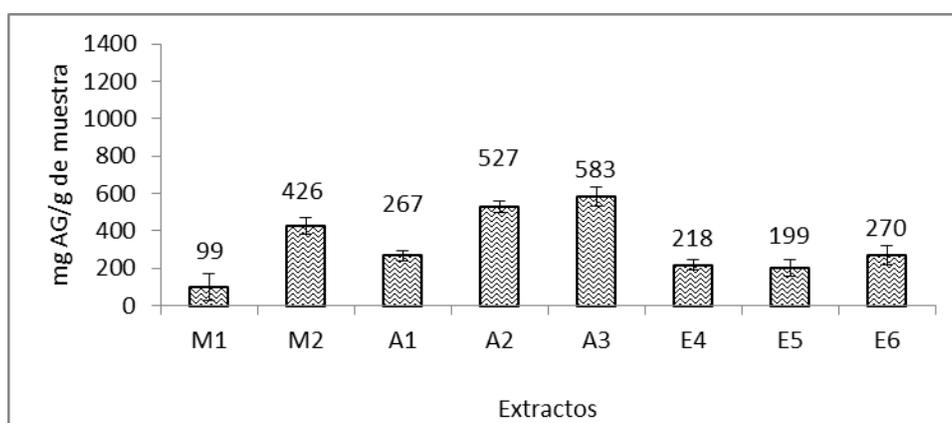
La **Figura 30** muestra la cantidad antioxidantes de los micelios de las cepas usadas en alcohol y resuspendido en alcohol 80:20 (E6) dando un valor 270 mg AG/g de muestra, mientras que el extracto acuoso resuspendido en agua (E4) alcanzó los 218 mg AG/g de muestra y, finalmente el extracto etanólico resuspendido en tequila (E5) obtuvo 199 mg AG/g de muestra.



**Figura 30.** Cantidad de antioxidantes de los extractos etanólicos obtenidos en agua (E4), en tequila (E5) y en alcohol 80:20 (E6) de la cepa CP-83 de *Agaricus* spp. a los 28 días de incubación.

### Efecto de los tratamientos para la extracción de la cantidad de antioxidantes del micelio seco de la cepa CP-83 de *Agaricus* spp.

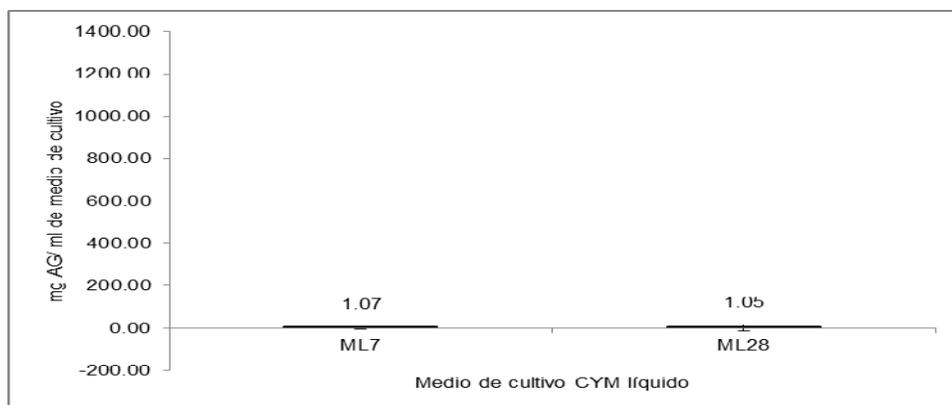
En la **Figura 31** muestra las cantidad de antioxidantes de los macerados (M1 y M2), extractos acuosos (A1, A2 y A3) y los extractos etanólicos (E4, E5 y E6) de la cepa CP-83, siendo los extractos acuosos los que mostraron una mayor cantidad de antioxidantes, así como el macerado tequila muestra también una buena concentración de antioxidantes. Sin embargo, los extractos etanólicos y el macerado agua fueron los de menor concentración de antioxidantes.



**Figura 31.** Cantidad de antioxidantes de los macerados (M1 y M2), extractos acuosos (A1, A2 y A3) y de los extractos alcohólicos (E4, E5 y E6) obtenido del micelio de la cepa CP-83 de *Agaricus* spp. a los 28 días de incubación.

### Antioxidantes en el medio líquido después de cultivar *Agaricus*

La concentración de antioxidantes en el medio de cultivo líquido usado para el crecimiento de la CP-89 a los 7 (ML7) y 28 (ML28) días, fueron casi similares, siendo de 1.07 mg AG/ mL de medio de cultivo ML7, y de 1.05 mg AG/ mL de medio de cultivo ML28 (**Figura 32**).

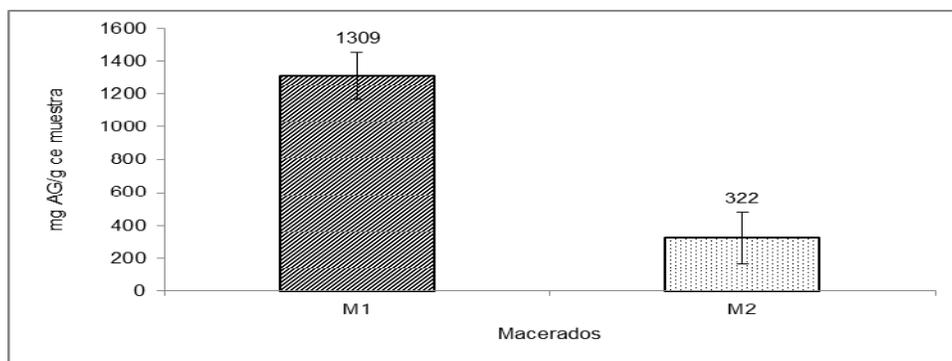


**Figura 32.** Cantidad de antioxidantes de los medios líquidos obtenidos en agua (M1) y en tequila (M2) obtenido del micelio de la cepa CP-83 de *Agaricus* spp. a los 28 días de incubación.

### 6.5.2 CP-89 de *Agaricus* spp.

#### Antioxidantes en los macerados

La **Figura 33** muestra las propiedades antioxidantes de los macerados (M1 y M2) de la cepa CP-89, siendo el macerado agua (M1) el que mostró la concentración más alta con 1309 mg AG/g de muestra, mientras que el macerado tequila presentó una concentración de 322 mg AG/g de muestra.

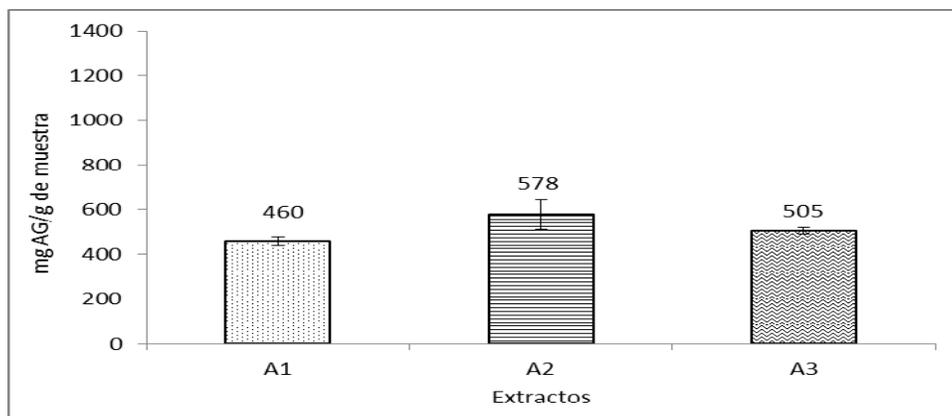


**Figura 33.** Cantidad de antioxidantes de los macerados obtenidos en agua (M1) y en tequila (M2) obtenido de micelio de la cepa CP-89 de *Agaricus* spp. a los 28 días de incubación.

#### Propiedades de los extractos acuosos

En los extractos acuosos, el extracto resuspendido en tequila (A2) presentó una concentración de 578 mg AG/g de muestra, demostrando mayor concentración en propiedades antioxidantes, el extracto acuoso resuspendido en alcohol 80:20 (A3) tuvo una concentración de 505 mg AG/g de muestra y, el extracto acuoso

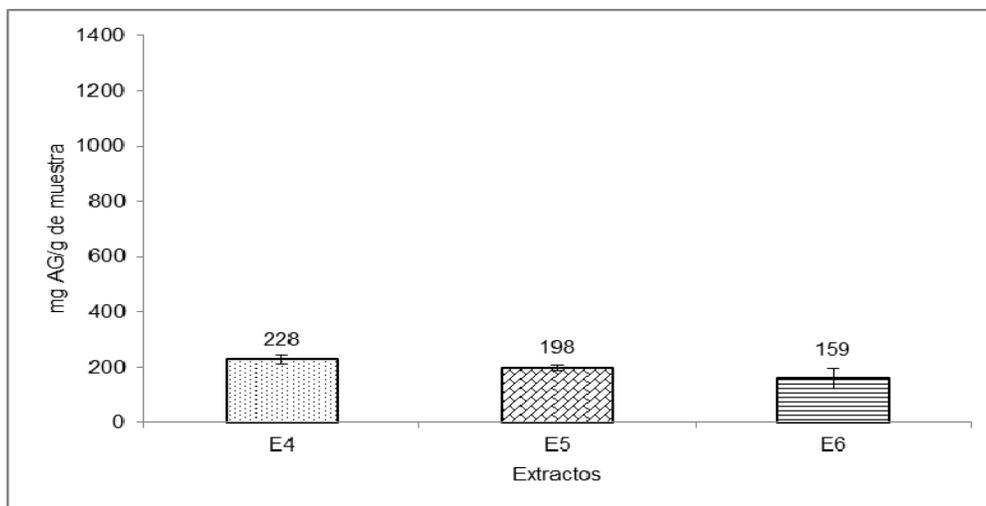
resuspendido en agua (A1) sólo alcanzó la concentración de 460 mg AG/g de muestra (**Figura 34**).



**Figura 34.** Cantidad de antioxidantes de los extractos acuosos obtenidos en agua (A1), en tequila (A2) y alcohol 80:20 (A3) obtenidos de micelio de la cepa CP-89 de *Agaricus* spp. a los 28 días de incubación.

### Propiedades de los extractos etanólicos

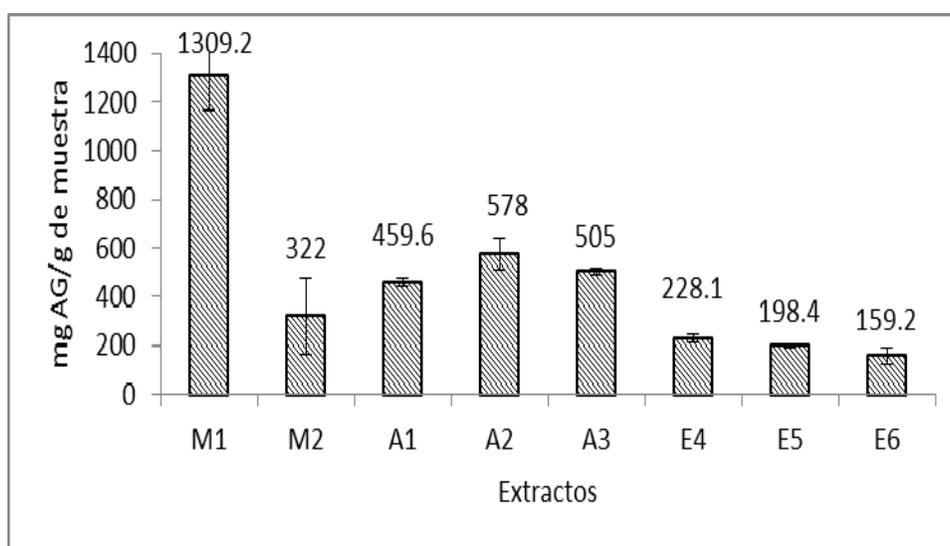
La **Figura 35** muestra las cantidades de antioxidantes de los micelios de las cepas usadas en alcohol y resuspendido en agua (E4) dando un valor de 228 mg AG/g de muestra, mientras que el extracto acuoso resuspendido en tequila (E5) alcanzó los 198 mg AG/g de muestra y, finalmente el extracto etanólico resuspendido en alcohol 80:20 (E6) obtuvo 159 mg AG/g de muestra.



**Figura 35.** Cantidad de antioxidantes de los extractos etanólicos obtenidos en agua (E4), en tequila (E5) y alcohol 80:20 (E6) obtenidos del micelio de la cepa CP-89 de *Agaricus* spp. a los 28 días de incubación.

### Efecto de los tratamientos en la cantidad de antioxidantes del micelio seco de la cepa CP-89 de *Agaricus* spp.

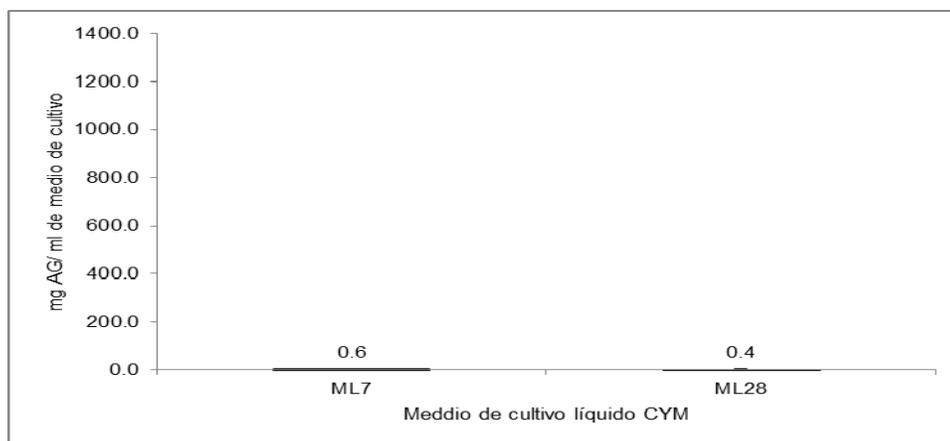
En la **Figura 36** muestra las propiedades antioxidantes de los macerados (M1 y M2), extractos acuosos (A1, A2 y A3) y los extractos etanólicos (E4, E5 y E6) de la cepa CP83, siendo el macerado de agua el que muestra un mayor concentración de antioxidantes, mientras que los extractos acuosos mostraron también ser una buena opción para obtener una concentración de antioxidantes aceptable. Sin embargo, los extractos etanólicos y el macerado tequila fueron los de menor concentración de antioxidantes.



**Figura 36.** Cantidad de antioxidantes de los macerados (M1 y M2), extractos acuosos (A1, A2 y A3) y de los extractos alcohólicos (E4, E5 y E6) obtenidos del micelio seco de la cepa CP-83 de *Agaricus* spp. a los 28 días de incubación.

### Propiedades del medio líquido usado para cultivar *Agaricus* spp.

La concentración de antioxidantes en el medio de cultivo líquido usado para el crecimiento de la CP-89 a los 7 (ML7) y 28 (ML28) días, fueron similares, siendo de 0.6 mg AG/ mL de medio de cultivo ML7, y de 0.4 mg AG/ mL de medio de cultivo ML28 (**Figura 37**). Como puede apreciarse del resultado obtenido en ambas cepas, en relación a la cantidad de antioxidantes en el medio de cultivo, la cantidad fue muy baja en comparación con aquellas obtenidas en los miceliales. Podemos decir que los antioxidantes extractos están presentes en el micelio y no son liberados al medio de cultivo.



**Figura 37.** Cantidad de antioxidantes de los medios líquidos obtenidos en agua (M1) y en tequila (M2) obtenidos del micelio seco de la cepa CP-89 de *Agaricus* spp. a los 28 días de incubación.

### 6.5.3 Comparación de las propiedades antioxidantes de las cepas en estudio

La **Figura 38A** muestra el comportamiento de cada uno de los extractos obtenidos a partir del micelio de la CP-83, en la que se observa que el extracto con una mayor concentración de antioxidantes lo mostró el extracto acuoso resuspendido en alcohol 80:20 (A3) con una concentración de 583.2 mg AG/g de muestra. En el caso de los extractos etanólicos, mostraron concentraciones menores a los de los extractos acuosos, que van de una concentración de 199.3- 270.4 mg AG/g de muestra en el caso de los macerados M2 mostró una concentración de 425.5 mg AG/g de muestra que fue mayor a la de los extractos acuosos; sin embargo, M1 mostró la lectura más bajas a una concentración de - 99.1 mg AG/g de muestra.

En el caso de la CP-89 de *Agaricus* spp. el macerado de agua (M1) mostró la concentración más alta con 1309.2 mg AG/g de muestra esta fue la cantidad más alta obtenida en ambas cepas y en todas las condiciones estudiadas; sin embargo, los extractos acuosos dieron concentraciones aceptables como en el caso de A1 con una concentración de 459.6 mg AG/g de muestra, A2 con una concentración de 578 mg AG/g de muestra, A3 con un valor de 505, en el caso de los extractos etanólicos se observó una concentración de 159.2 mg AG/g de muestra (E6), 198.4 mg AG/g de muestra (E5) y 228.1 mg AG/g de muestra (E4) los cuales son menores a los obtenidos en los extractos acuosos (**Figura 38B**).

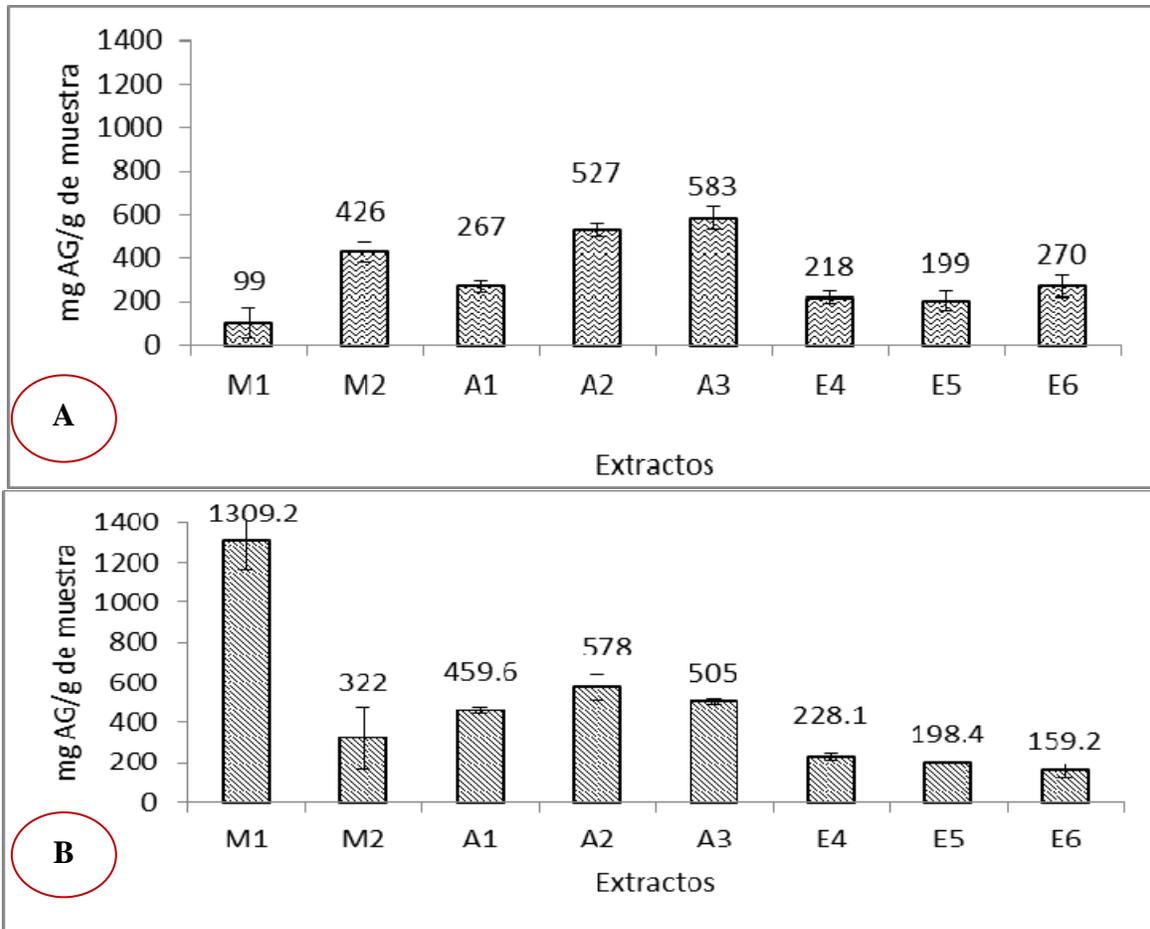
Comparando la actividad antioxidante de las cepas en estudio de *Agaricus* spp. (CP-83 y CP-89) presentaron una mayor concentración de antioxidantes en los extractos acuosos sin tomar en cuenta en que fueron resuspendidos. Tsai *et al.* (2007) obtuvo una mayor concentración de antioxidantes en los extractos etanólicos en comparación a los acuosos. Sin embargo, los rendimientos obtenidos por nosotros en el presente trabajo fueron superiores a los obtenidos en otros trabajos a partir de otros hongos medicinales como *Coriolus versicolor* (9,16%) y *Ganoderma lucidum* (5,61%) (Mau *et al.*, 2002a) donde utilizaron metanol como disolvente, pero eran similares a los encontrados para varios hongos comestibles, con rendimientos que van desde 15,9% a 43,9% (Mau *et al.*, 2002b; Yang *et al.*, 2002) y tomando en cuenta que en la mayoría de los trabajos realizados trabajan con el cuerpo fructífero, y en el presente estudio se trabajó con solo 0.2 g de micelio con el cual se fue capaz de dar una buena concentración de antioxidantes y que pueden ser competitivas con las obtenidas a nivel de cuerpo fructífero.

Recientemente, los hongos comestibles han llamado la atención como una fuente de alimento funcional el desarrollo de nuevas medicinas. Además, de los hongos secos, una fuente alternativa o substituta de alimento, saborizante de alimento o en la formulación de alimentos funcionales o nutraceuticos. Los hongos comestibles han sido utilizados como fuente de alimento por siglos y de manera particular con fines medicinales en el sureste de Asia (Lindequist *et al.*, 2005). En el presente trabajo, se estudió la actividad antimicrobiana de extractos acuosos y alcohólicos de micelio de dos cepas de *Agaricus* spp. sobre una cepa de *Escherichia coli*, así su cantidad de antioxidantes.

En base a los resultados obtenidos con los extractos de la cepa de *Agaricus* CP-89 se puede considerar potencialmente como una nueva fuente de agentes antimicrobianos. Como se sabe actualmente, las bacterias están desarrollando resistencia a los antibióticos, por lo que se requiere de la búsqueda de nuevas fuentes de control de estos organismos que causan enfermedades, por lo que los

extractos de micelio de hongos comestibles puede ser una alternativa para este control. Barros *et al.*, 2007, estudiaron extractos de varios hongos comestibles contra diferentes bacterias, entre ellas *E. coli* y mencionan que ninguno de sus extractos inhibió su crecimiento. En el presente trabajo se encontró que las dos cepas de *Agaricus* redujeron el crecimiento de esta bacteria. Los compuestos antioxidantes poseen diversas actividades, tales como antiinflamatorios, anti cancerígenos y anti arteriosclerótico, entre otras. En nuestro caso el contenido total de fenoles en extractos miceliales de dos especies del hongo comestibles *Agaricus* fue evaluado por el método del Folin-Ciocalteu.

Como se puede apreciar en la **Figura 38**, el mayor contenido de compuestos fenólicos se encontró en la cepa CP-89, en el macerado de agua (M1), seguido del extracto acuso (A1, A2 y A3). El contenido más bajo se encontró en el extracto etanólicos (E4, E5 y E6). Este tipo de investigaciones son importantes para incrementar nuestro conocimiento sobre las propiedades de los recursos genéticos de los hongos comestibles en nuestro país. Las cepas estudiadas mostraron ser una buena fuente de antioxidantes, las cuales pueden ser usadas contra enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, aplicaciones dermatológicas y como suplementos en la industria alimenticia.



**Figura 38.** Cantidad de antioxidantes de 4 macerados (M1 y M2), 3 extractos acuosos (A1, A2, A3) y 3 extractos etanólicos (E4, E5, E6) obtenidos del micelio seco de las cepas CP-83 (A) y CP89 (B) de *Agaricus* spp.

## VII. CONCLUSIONES

1. De las 15 cepas de *Agaricus* spp. con las que se inició el trabajo de investigación sólo la CP-83 y CP-89 fueron las que mostraron un rápido crecimiento y la generación suficiente de biomasa para realizar los estudios propuestos.
2. La CP-83 mostró un mejor efecto sobre el crecimiento la bacteria *Escherichia coli* en el macerado de agua (M1) y en el extracto acuoso resuspendido en agua (A1).
3. La CP-89 tuvo un mejor efecto sobre el crecimiento de la bacteria *Escherichia coli* en los extractos: acuoso resuspendido en agua (A1), etanólico resuspendido en agua (E4) y etanólico resuspendido en alcohol (E6).
4. Tanto en la cepa CP-83 y CP-89 el efecto sobre el crecimiento de la bacteria del extracto acuoso resuspendido en agua (A1) fue el mejor en ambas.
5. En la CP-83 los extractos acuosos mostraron un mayor contenido de antioxidantes.
6. En la CP-89 el macerado de agua y los extractos acuosos fueron los que mayor contenido de antioxidantes mostraron.
7. Tanto en la CP-83 y CP-89 la mayor concentración de antioxidantes se localizó en los extractos acuosos.

## VIII. RECOMENDACIONES

### 8.1 Recomendaciones generales

Debido a que los objetivos de esta investigación estuvieron encaminados a la generación de conocimiento a partir de los datos obtenidos y analizados sobre las propiedades antioxidantes y antimicrobianas a nivel micelial de cepas nativas de *Agaricus* spp., se propone:

- a) Seguir con la investigación de propiedades antioxidantes y antimicrobianas presentes en las cepas nativas de *Agaricus* spp. provenientes de México.
- b) Determinar a las propiedades antioxidantes y antimicrobianas del género de *Agaricus* a nivel del cuerpo fructífero, ya que el cuerpo fructífero es el que se consume y comercializa.
- c) En el caso de los datos obtenidos en la presente investigación a nivel micelial se podría aplicar este conocimiento en la creación de un producto como té o bebidas funcionales a partir del micelio. Tales con aplicaciones benéficas a las empresas del ramo.
- d) La divulgación de los beneficios que nos ofrece el consumo de champiñón es de gran importancia en el mercado, ya que aumentaría del consumo de *Agaricus*, beneficiando a los productores de champiñón.

Para lograr cada una de estas propuestas se recomienda seguir estrategias particulares para cada una de ellas. Por lo que resulta pertinente mencionar algunas definiciones de estrategia.

## **IX. ESTRATEGIA PROPUESTA PARA EL APROVECHAMIENTO Y USO DE LOS RECURSOS MICOLÓGICOS DE LAS CEPAS DE *Agaricus* spp.**

### **9.1 Definición de estrategia**

A lo largo de la historia, la palabra estrategia se ha utilizado con diferentes connotaciones. Desde la guerra, donde se percibe como los planteamientos o propuestas para atacar al enemigo; en el campo comercial, donde la estrategia es el plan o patrón que integra las metas y políticas principales de una organización, estableciendo la secuencia coherente de las acciones a analizar (Mintzberg y Brian, 1993); y en la política, donde estrategia se refiere a determinar y evaluar las opciones de que se puede disponer, con el fin de encontrar las mejores para realizar el proceso de desarrollo; en otras palabras se trata de comprender las reacciones probables del sistema frente a diferentes acciones alternativas con el fin de alcanzar eficientemente los objetivos establecidos (Domínguez y Aguilar, 1999). De hecho, se considera que la estrategia es la columna vertebral de los planes y programas de desarrollo, dado que éstas son acciones que se realizan en forma ordenada, sistemática y dirigida para conseguir el fin deseado (Baltazar, 2002).

Independientemente del campo de aplicación de una estrategia, ésta se concibe mejor si se analiza su concepto según López (2005), quien la define como un proceso regulable, un conjunto de reglas que aseguran una decisión óptima en cada momento. Donde el término proceso, incorpora la idea, las etapas y los tiempos para el logro de los objetivos; el término regulable, indica la existencia de normas que pueden ser aplicables al proceso y justifica su objeto de estudio.

Desde la perspectiva gubernamental, la estrategia implica la utilización y profunda integración del poder económico, político, y social (cultural, moral, espiritual y psicológico). Lo que significa que las autoridades deben plantear estrategias para aminorar el rezago económico y social que prevalecen en las poblaciones rurales del país, mediante la aplicación de programas de desarrollo concebidos como una

estrategia que permita proveer de mejores condiciones a la población rural para dar principio a una de las bases fundamentales del desarrollo del país. En el caso del Desarrollo Agrícola Regional, la estrategia ha sido definida por varios autores como Matus (1972), siendo para él, un análisis y un propósito de futuro que integra lo económico y lo político-social con el fin de dirigirlos a objetivos determinados. Éstas se basan en un modelo abstracto del proceso material de desarrollo, el cual ante hechos y perturbaciones simuladas, responde y reacciona igual que en forma real junto con sus consecuencias. Sin embargo, el plan de la estrategia puede modificarse cuando se lleva a cabo, con el fin de que cumpla su objetivo (Matus, 1980). De esta forma, la formulación de una estrategia parte de una síntesis entre realidad y proyecto, con lo que se obtiene una imagen preliminar (diagnóstico) de dicho proceso, requiriendo además, imaginación, capacidad técnica, y principalmente, un análisis riguroso de la viabilidad.

Para que se lleve a cabo una estrategia, García- Herrera (2004), propuso tres sectores como elementos fundamentales, y con tareas específicas interrelacionadas y complementarias: los productores y sus familias, los técnicos y científicos, y los representantes y miembros de instituciones de apoyo a la producción y al desarrollo agrícola y rural. De tal manera que su acción coordinada mantendrá la estrategia y dará logros económico-sociales, con lo que se podrá promover el desarrollo agrícola y rural de una región. Donde el desarrollo implica el logro de las condiciones con las cuales, la mayoría de la gente pueda tener acceso a los recursos necesarios para satisfacer no tan sólo sus necesidades fundamentales, sino para alcanzar niveles de vida y de bienestar aceptables, como son la alimentación, la educación, la seguridad, la salud mental, la recreación, y la integración social.

En base a lo mencionado, el término de estrategia fue incluido en la agricultura en el año 1967 en el Plan Puebla, siendo éste el primer Proyecto de Desarrollo Agrícola Regional que involucra el concepto de estrategia como guía para sus acciones y decisiones (Casas, 1994).

En conclusión la planificación estratégica, como lo mencionan Mintzberg y Brian (1993) “es establecer la orientación general de una empresa y su viabilidad máxima a la luz, tanto de los cambios predecibles como los impredecibles que, en su momento, puedan ocurrir en los ámbitos que son de su interés o competencia. Estas decisiones son las que auténticamente moldean las verdaderas metas de la empresa y las que contribuyen a delinear los amplios límites dentro de los cuales habrá de operar”. En este razonamiento la planificación estratégica nos ayuda a ser más precisos en la toma de decisiones. En este contexto una estrategia está conformada por una serie de cursos de acciones que permiten alcanzar las metas y objetivos que se ha planteado una organización. Un planteamiento adecuado ayuda a poner orden y asignar, con base tanto en sus atributos como en sus deficiencias internas, los recursos de una organización, con el fin de lograr una situación viable y original, así como anticipar posibles cambios en el entorno y las acciones imprevistas de los oponentes. Las estrategias formales consideran, entre otras, las siguientes dimensiones: las metas y objetivos, diagnóstico en base a la evaluación de los recursos con los que se cuenta dentro del contexto al cual pertenece la estrategia o secuencia de acciones jerárquicamente realizadas, la implementación así como los mecanismos de seguimiento y control.

## **9.2 Diseño del paquete tecnológico del cultivo de *Agaricus spp.***

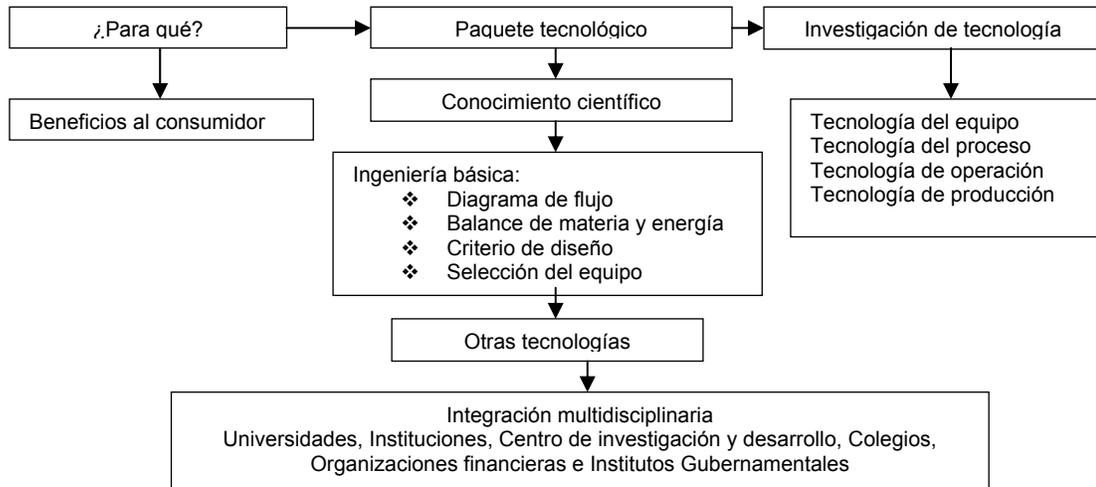
El cultivo de *Agaricus* representa una importante actividad económica. A nivel rural permitiría un importante aporte económico para familias de escasos recursos ya que la demanda de este hongo a nivel mundial e incluso a nivel nacional se ha venido incrementando.

La adopción del paquete tecnológico a nivel industrial que va desde la producción del hongo hasta la producción del micelio en fermentadores biológicos representa una alternativa económica importante pues, al iniciar el proceso se requiere de gente capacitada así como, mano de obra, lo cual impulsa la generación de empleos. Es importante reiterar que el uso de sustratos o fórmulas alternativas como los desarrollados en el Colegio de Postgraduados, *Campus Puebla* apoyan

a la disminución de la degradación del medioambiente ya que el reciclado de sustratos como virutas de encino, olote de maíz, salvado de trigo, bagazo de caña y algunos otros desechos agroindustriales apoyan a disminuir el deterioro del ambiente, principalmente la tala de árboles, y su recolección resulta ser económica la cual es un atributo que hacen beneficioso el cultivo y producción de este hongo. La elaboración de sustratos (composta) a partir del desecho de la post-cosecha, la integración de este desecho al suelo (suelos para cultivos principalmente) puede ayudar a regenerar micro y macro-nutrientes que son consumidos tanto por cosechas excesivas y/o problemas de monocultivo. De igual manera, la incorporación de microorganismos como bacterias y hongos micorrízicos producto del proceso de composteo de los desechos, resulta benéfico al suelo por las interacciones que se dan planta-microorganismo. Un aporte más, es la utilización de este hongo ó el resultado de su actividad metabólica (enzimas) para remediación de sitios contaminados con compuestos recalcitrantes, ya que, considerando que es conocido como hongo de la pudrición blanca y su sistema enzimático es capaz de degradar lignina compuesto químico que tiene similitud con los compuestos derivados del petróleo lo hace un organismo ideal para solucionar problemas de contaminación del ambiente.

Actualmente, con el avance de los conocimientos que se tienen sobre los macromicetos respecto a su fisiología, ciclo de vida, bioquímica, eficiencias biológicas, ciclos de producción y tasas de producción, es posible diseñar modelos estratégicos que den como resultado la solución de problemas de carácter social, económico y ecológico. Aún más, es posible la aplicación de determinadas especies biológicas para zonas con requerimientos especiales. El Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles cuenta con una vasta colección de recursos de hongos comestibles de distintos géneros y especies, estas cepas fueron recolectadas en condiciones de distinta condición ambiental, lo cual establece de éstas un verdadero recurso genético con gran potencial de explotación. Agregado al conocimiento biológico *per se* del organismo, aunado al avance de la tecnología se puede realizar estrategias para mejoras genéticas y

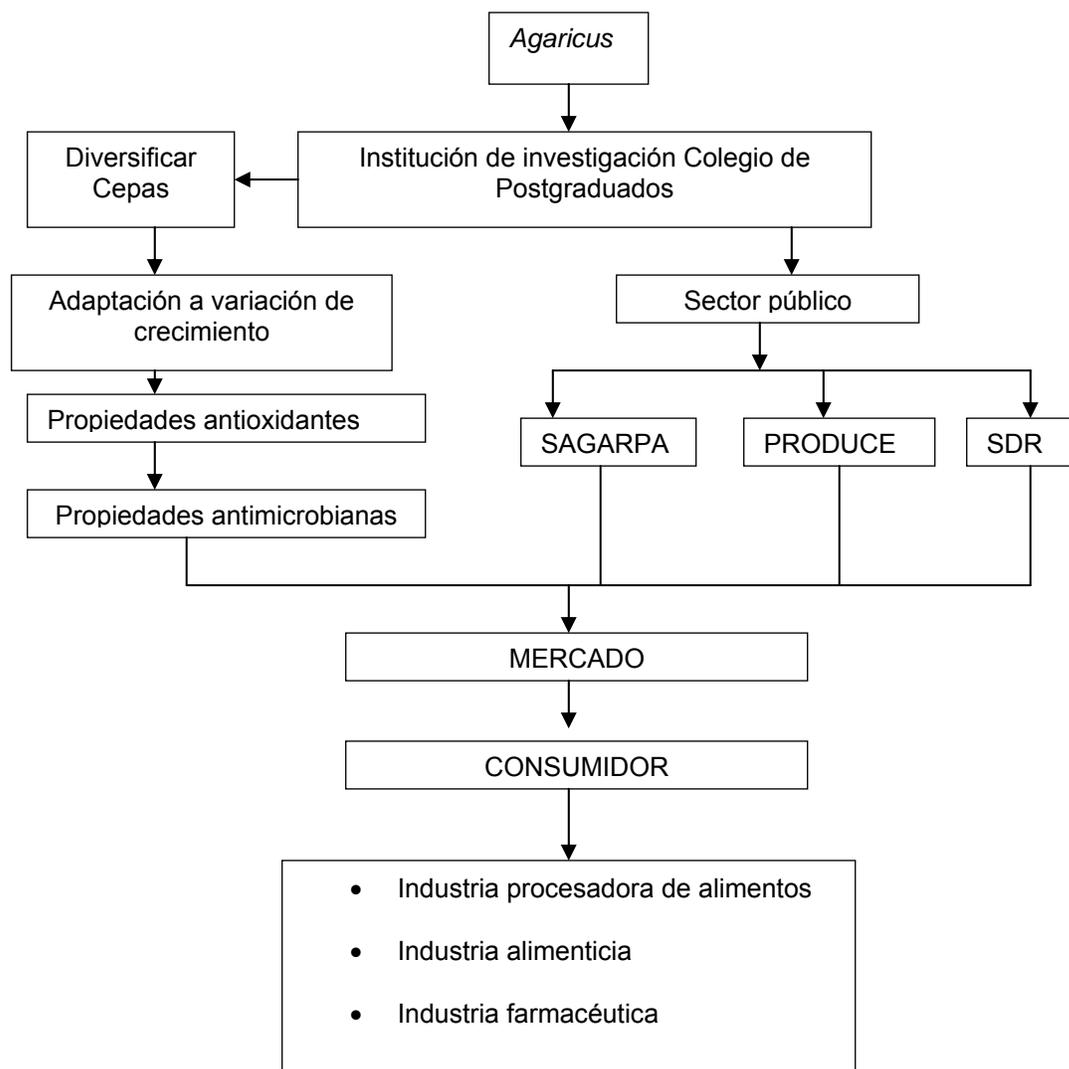
lograr obtener cepas competitivas para el mercado. En la **Figura 39** se puntualizan los elementos que se toman en cuenta para el diseño del paquete tecnológico generado en esta investigación.



**Figura 39.** Diagrama de flujo para el diseño del paquete tecnológico generado en esta investigación.

### 9.3 Aplicación del método estratégico

Para tener una mejor aplicación de la estrategia es necesaria la utilización de un mapa conceptual que nos guíe de una manera más explícita en las diferentes intervenciones y los diferentes actores participantes (**Figura 40**).



**Figura 40.** Estrategia propuesta para el aprovechamiento y uso de los recursos genéticos de las cepas de *Agaricus*.

## **9.4 Actores de la estrategia**

Con base a lo anterior, se considera los siguientes sectores:

1. Los productores a quienes se dirige la estrategia.
2. Los consumidores que finalmente son los que aprueban o desaprueban el producto.
3. El Colegio de Postgraduados, *Campus* Puebla y otras instituciones especializadas en la biotecnología de los hongos comestibles que mediante su investigación logran proporcionar a los productores nuevas propuestas de cepas para producción. Asimismo, extender el mercado de la producción de los hongos comestibles.
4. El sector Gobierno, a través de la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), Fundación PRODUCE y otros organismos que están disponibles para brindar apoyo técnico, financiamiento y administrativos a los productores de hongos comestibles.

### **9.4.1 Centro de investigación Colegio de Postgraduados**

En primera estancia, mediante la investigación nosotros generamos la información necesaria para la generación de conocimiento dentro del programa de maestría con el apoyo del Colegio de Postgraduados y recursos del CONACYT, con lo que se dan propuestas y recomendaciones para futuras investigaciones a realizar con las cepas de *Agaricus* a nivel de propiedades funcionales.

### **9.4.2 Sector Público**

Para una mejor divulgación de los beneficios que proporciona el consumo de champiñón, se pretende pedir apoyo de las diferentes instancias gubernamentales, como son SAGARPA; SDR y SEDESOL, con la finalidad de transferir el conocimiento necesario. Ya que estas instancias gubernamentales están encargadas de incrementar el conocimiento y la capacidad de gestión, así como poner en práctica políticas sustentables para el desarrollo de la agricultura bajo sistemas de innovación para productores y con rumbo a la solución de problemas en las diferentes regiones del país. Si se alcanza la innovación en la

agricultura bajo estos paquetes tecnológicos, se tendrá una agricultura más productiva, menos vulnerable ante la inestabilidad climática y en consecuencia generadora de empleos y mejores ingresos para los productores del campo.

#### **9.4.3 Mercado**

En la estrategia debe presentarse un análisis de mercado de hongos comestibles para una mejor venta del producto y una mejor obtención de recursos económicos. Por una parte se buscará la venta a consumidores de manera directa, aunque en su mayoría se realizara mediante el apoyo de intermediarios, los cuales son denominados “canales de mercadeo” o de “distribución”; estos son conjuntos de organizaciones interdependientes que participan en el proceso de hacer accesible un producto o servicio para su uso o consumo en el momento preciso, en el lugar adecuado. Los miembros del canal de *marketing* realizan diversas funciones como reunir información acerca de los clientes y competidores reales y potenciales, asumiendo riesgos relacionados con el trabajo del canal de la comercialización, se encargan del almacenamiento y movimiento sucesivo de productos físicos, entre otros.

En este caso los hongos comestibles en especial el champiñón, son colocados de una manera de gran facilidad en el mercado ya que es un producto muy conocido, y con la divulgación de que el champiñón es un alimento funcional lo cual le da una mayor plus valía que aumentaría su venta en el mercado. Y con lo cual se da un beneficio económico a los productores.

#### **9.4.4 Consumo**

Dar a conocer al consumidor los beneficios del champiñón, con lo cual se pretende disuadir al consumidor para aumentar las ventas en el mercado por los beneficios que este producto proporciona.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Agrobit, 2005. Champiñones (*Agaricus bisporus*) (en línea). BIT Soluciones Informáticas, Córdoba, Argentina. 5p. Consultado 16 abr. 2007. Disponible en <http://www.agrobit.com/Microemprendimientos/cultivos/hongos/MI000002ho.htm>
- Baltazar, F. 2002. Papel de las organizaciones tradicionales para el desarrollo de comunidades marginadas en la Sierra Norte de Puebla. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México.
- Barros, L., R. C. Calhelha, J. A. Vaz, I. C. F. R. Ferreira, P. Baptista y L.M. Estevinho. 2007. Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts. *European Food Research and Technology* 225: 151–156.
- Barros, I., S. Falcao, P. Baptista, C. Freire, M. Vilas y I. Ferreira, 2008. Antioxidant activity of *Agaricus* spp. Mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Food Chemistry* 111: 61-66.
- Casas, R. 1994. Estrategias para el desarrollo agrícola regional en proyectos con enfoque de sistemas: caso del proyecto prototipo agropecuario del Plan Puebla. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México.
- Challen, M. P., A. J. Moore y D. Martínez –Carrera, 1995. Facile extraction and purification of filamentous fungal DNA. *Bio Techniques* 18: 975-978.
- Chang, S. T. y P. G. Miles, 1989. *Edible mushrooms and their cultivation*. CRC Press. Boca Ratón Florida. U.S.A. 345 Pp.
- Chang, S. T., 1999. World production of cultivated edible and medicinal mushrooms in 1997 with emphasis on *Lentinus edodes* (Berk). *International Journal of Medicinal Mushrooms* 1: 291–300.
- Chang, S. T. y P. G. Miles, 2004. *Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, environmental impact*. CRC Press, Boca Ratón. 451 pp.
- Deacon, J. W., 1990. *Introducción a la micología moderna*. México. Editorial Limusa. 350 pp.
- Domínguez, T. y A. Aguilar. 1999. Elementos de estrategia para el desarrollo agrícola en una unidad de riego en el estado de Veracruz. México. *Terra* 17: 345-354.
- Elmastas, M., O. Isildak, I. Turkekul y N. Temur, 2007. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. *Journal Food Composition and Analysis* 20: 337-345.
- El Kattan, M. H., Z. A Helmy, M. A. El Leithy y K. A. Abdelkwai, 2001. Studies on cultivation techniques and chemical composition of oyster mushrooms. *Mushroom Journal of the Tropics* 11: 59–66.
- Fletcher, J. T., P. F. White y R. H. Gaze, 1997. *Mushrooms: Pest and disease control*. Intercept, England. 176 Pp.
- Fox, F. M., 1993. Tropical fungi: their commercial potential. In: *Aspects of Tropical Mycology* (S. Isaac, J. C. Frankland, R. Watling y A. J. S. Whalley, Eds): 253-264. Cambridge University Press, Cambridge, UK. Pp.
- García-Herrera, E. 2004. Componentes de una estrategia para el desarrollo agrícola regional en Pinos, Zacatecas: el nopal tunero como su elemento central. *Comunicaciones en Socioeconomía, Estadística e Informática*. 8: 83-102.
- Gea, F. J., 2002. Plagas y enfermedades del género *Pleurotus*. In: *La biología y el cultivo*

- de *Pleurotus* spp. pp. 205-224. Sánchez, J. E. y D. Royse. Ed. Limusa. Pp.
- GemL, J., D. M. Geiser & D. J. Royse. 2004. Molecular evolution of *Agaricus* species based on ITS and LSU rDNA sequences. *Mycological Progress* 3: 157-176.
- Imtiaj, A. y L. Tae-Soo., 2007. Screening of antibacterial and antifungal activities from Korean wild mushrooms. *World Journal of Agricultural Sciences* 3 (3): 316-321.
- Kawagishi, H., Katsumi, R., Sazawa, T., Mizuno, T., Hagiwara, T., y Nakamura, T. 1989. Cytotoxic steroids from the mushroom *Agaricus blazei*. *Phytochemistry*, 27, 2777–2779.
- Kinrus, A., 1976. The advantages and disadvantages of re-using spent compost as a casing soil. *Mushroom News* 24(10): 5-8.
- Labarère, J. y F. Bois, 2002. La conservación y el uso de los recursos genéticos de *Pleurotus* spp. pp 8-123. Sánchez, J.E. y D. Royse. Eds. Limusa.
- Lakhanpal, T. N. y M. Rana, 2005. Medicinal and nutreutical genetic resources of mushrooms. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization* 3: 288-303.
- Leal, L. H., 1985. El cultivo del champiñón y otros macromicromicetos comestibles en el desarrollo de la biotecnología en México. R Quintero (comp.), CONACYT, pp. 235-257.
- Le Roith, D., J. Shiloach y J. Roth, 1982. Is there an earlier phylogenetic precursor that is common to both the nervous and endocrine systems? *Peptides* 3 (3): 211-215
- Lindequist, U., Niedermeyer, T.H.J. y Julich, W-D. 2005. The pharmacological potential of mushrooms. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2(3): 285-299.
- Litchfield, J. H., 1967. Morel mushroom mycelium as a food-flavoring material. *Biotechnology and Bioengineering* 9: 289-304.
- López, F. 2005. Elementos para el diseño de estrategias eficaces de gestión de la información agraria. Fundación General de la UNED.
- Lull, C., H. Wichers y H. Savelkoul, 2005. Anti-inflammatory and Immunomodulating properties of fungal metabolites. *Mediators of Inflammation*. pp. 63-80.
- Martínez-Carrera, D. y P. Morales. 1988. Variación morfológica y fisiológica de *Pleurotus ostreatus* en la región de Xalapa, Veracruz, México. *Micol. Neotrop. Apl.* 1: 71-78.
- Martínez-Carrera, D., R. Leben, P. Morales, M. Sobal y A. Larqué-Saavedra, 1991. Historia del cultivo comercial de los hongos comestibles en México. *Ciencia y Desarrollo* 96: 33-43.
- Martínez-Carrera, D., P. Morales, M. Sobal, A. Larqué-Saavedra. 1992. Reconversión en la industria de los hongos? *Tecnología (CONACYT)* 7: 52-59.
- Martínez-Carrera, D., M. Sobal, A. Aguilar, M. Navarro, M. Bonilla y A. Larqué-Saavedra, 1998. Canning technology as an alternative for management and conservation of wild edible mushrooms in Mexico. *Micología Neotropical Aplicada* 11: 35-51.
- Martínez-Carrera, D., 2000. Mushroom biotechnology in tropical America. *International Journal of Mushroom Sciences* 3: 9-20.
- Martínez-Carrera, D., 2002. Current development of mushroom biotechnology in Latin America. *Micología Aplicada Internacional* 14: 61-74.
- Martínez-Carrera, D., P. Morales, M. Sobal, M. Bonilla y W. Martínez. 2006. México ante la globalización en el siglo XXI: el sistema de producción-consumo de los hongos comestibles. *In: El cultivo de Pleurotus en México*. ECOSUR-IE-UNAM-COLPOS, México, D.F.

- Martínez-Carrera, D., P. Morales, M. Sobal, M. Bonilla y W. Martínez, 2007. México ante la globalización en el siglo XXI: el sistema de producción consumo de los hongos comestibles. Capítulo 6.1, 20 pp. *In: El cultivo de setas Pleurotus spp. en México.* J. E. Sánchez, D. Martínez-Carrera, G. Mata y H. Leal (Eds.). ECOSUR-CONACYT, México, D.F. ISBN 978-970-9712-40-7.
- Matus, C. 1972. Estrategia y Plan. 11ª Edición. Siglo XXI. Editores. México. 198 Pp.
- Matus, C. 1980. Planificación de situaciones. 1ª Edición. Fondo de Cultura Económica. México. 376 Pp.
- Mau, J. L., H. C. Lin y C. C. Chen. 2002a. Antioxidant properties of several medicinal Mushrooms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 6072–6077.
- Mau, J. L., H. C. Lin y S. F. Song. 2002b. Antioxidant properties of several specialty mushrooms. *Food Research International* 35: 519–526.
- Mehmet, O., E. D. Mehmet, K. Seyda, M. D. Nazime, T. Aziz y A. O. Mehmet, 2001. *In vitro* antioxidant anticholinesterase and antimicrobial activity student on three *Agaricus* species with fatty acid compositions and the three most edible mushrooms. *Food and Chemical Toxicology* 49: 1353- 1360
- Mintzberg, H. y J. Brian.1993. El proceso estratégico. Prentice Hall. Segunda edición. México, D.F. 1207 p.
- Moll, H. M., 1986. *Champiñón, economía, producción y comercialización.* España Universidad de Zaragoza. 87 pp.
- Morales, P., M. Sobal, M. Bonilla, W. Martínez, P. Ramírez, I. Tello, T. Spezzia, N. Lira, R. De Lima, S. Villa, E. Montiel & D. Martínez-Carrera. 2010. Los hongos comestibles y medicinales en México: recursos genéticos, biotecnología, y desarrollo del sistema de producción-consumo. Pp. 91-108. *In: Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI.* D. Martínez-Carrera, N. Curvetto, M.
- Müller, L., S. Gnoyke, A. M. Popken y V. Bohm, 2010. Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations. *Food Science and Technology* 43: 992-999.
- Pacioni, G., 1987. *Cultivo moderno de champiñón.* España. Editorial de Vecchi. 73 pp.
- Rigau, A. 1985. *Champiñón y trufa.* Barcelona España. Editorial Sintes, S.A. 167 pp.
- Sánchez, J. E. y D. J. Royse, 2002 *La biología y el cultivo de Pleurotus spp.* pp. 141-156. UTEHA – ECOSUR. México, DF ISBN 9-681-86357-7.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis , 1989 Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Setas de Cuivá. 2007. Productos frescos, valor nutricional: Composición del champiñón (en línea). Setas colombianas S.A. Medellín, Colombia. Consultado 19 de may. 2007. Disponible en: <http://www.setascolombianas.com/setas.asp>
- Sobal, M., P. Morales, W. Martínez, D. N. Pegler y D. Martínez-Carrera, 1997. Cultivation of *Lentinus levis* in Mexico. *Micología Neotropical Aplicada* 10: 63-71.
- Sobal, M., D. Martínez-Carrera, P. Morales, y S. Roussos, 2007. Classical characterization of mushroom genetic resources from temperate and tropical regions of Mexico. *Micología Aplicada Internacional* 19 (1): 15-23.
- Sobrino, E. y E. Sobrino, 1994. *Tratado de horticultura herbácea.* Volumen III: hortalizas de hojas, de raíz y hongos. Aedos. Barcelona. 313 Pp.

- Solonons, G. I., 1975. *Submerged culture production of mycelial biomass*. In: The filamentous fungi. Vol.1 Eds. J. E. Smith y D. R. Berry, pp. 249-264.
- Soriano-Santos, J., Guerrero-Legarreta, I. y Ponce-Alquicira, E. (2006). Acción antioxidante de los flavonoides de frutas y verduras para la preservación de la salud. *Contactos Revista de Educación en Ciencias e Ingeniería* 62: 46-54.
- Tamura K., Dudley J., Nei M. y S. Kumar, 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology Evolution* 24(8): 1596–1599.
- Tormo Molina, R. 1996. Los hongos: generalidades (en línea). Lecciones hipertextura de botánica. España. Disponible en <http://www.unex.es/polen/LHB/hongos/hongos0>.
- Tsai, K.J., Y.C. Tsai, C.K.J. Shen. 2007. G-CSF rescues the memory impairment of animal models of Alzheimer's disease. *J. Exp. Med.* 204:1273–1280.
- Tsai, S., S. Huang, S. Lo., T. P. Wu, P. Y. Lian y J. L. Mau, 2010. Flavor components and antioxidant properties of several cultivated mushrooms. *Food Chemistry* 113: 578-584.
- Urbanelli, S., V. Della Rosa, C. Fanelli, A. Fabbri y M. Reverberi, 2003. Genetic diversity and population structure of the Italian fungi belonging to the taxa *Pleurotus eryngii* (DC: Fr.) Quél and *P. ferulae* (DC: Fr.) Quél. *Heredity* 90: 253–259.
- Van Griensven, L. J. L. D. 1988. The cultivation of mushrooms. *Darlington Mushroom Laboratories Ltd*, Rustington, Sussex, England, Somycel S. A. & Langeais, France Edición 5. 515 Pp.
- Vedder, P. J. C., 1966. *Cultivo moderno de champiñón*. Madrid, España. Ediciones Mundi Prensa. 369 p.
- Wasser S.P. 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 60: 258-274.
- White, T. J., S. Bruns y J. Taylor, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White (eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, CA, 315-322.
- Yang, J. H., H. C. Lin y J. L. Mau. 2002. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chemistry* 77: 229–235.

## **XI. ANEXOS**

### **Anexo 1**

#### **Preparación del medio de cultivo**

##### **CYM sólido**

El medio CYM sólido es un medio de cultivo nutritivo que se compone de 7 reactivos los cuales son; 0.7 g peptona, 7 g dextrosa, 0.7 g extracto de levadura, 0.175 g sulfato de magnesio ( $MgSO_4$ ), 0.161 g fosfato diácido de potasio ( $KH_2PO_4$ ), 0.35 g fosfato monoácido de potasio ( $K_2HPO_4$ ), 7 g agar bacteriológico, los cuales se disolvieron en agua destilada y esterilizaron a  $121^\circ C$  durante 25 minutos en una botellas de 500 mL (Duran, Alemania), finalmente se vertieron en cajas de Petri estériles de plástico (90 mm de diámetro) bajo condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar (VECO), cada una con aproximadamente 20 mL de medio de cultivo.

##### **CYM líquido**

El medio CYM líquido se compone de 6 reactivos que son; 0.7 g peptona, 7 g dextrosa, 0.7 g extracto de levadura, 0.175 g sulfato de magnesio ( $MgSO_4$ ), 0.161 g fosfato diácido de potasio ( $KH_2PO_4$ ), 0.35 g fosfato monoácido de potasio ( $K_2HPO_4$ ), los cuales se disolvieron en agua destilada, se vertieron en matraces de 250 mL y, se esterilizó a  $121^\circ C$  durante 25 minutos

## **Anexo 2**

### **Obtención de biomasa por el método de homogenización e inóculo**

Para la obtención del inóculo se aplicaron dos métodos; homogenización y por inóculo, donde la homogenización se realizó a partir de 3 inóculos de 0.5 cm de una caja de Petri previamente colonizada en un 1 mL agua destilada estéril los cuales se homogenizaron (PRO250) a 11030 rpm por un minuto y cincuenta segundos, se utilizaron 150 µl para inocular el medio de cultivo y finalmente se incuban a 25°C temperatura ambiente. El segundo método se sembró utilizando 3 inóculos de 0.5 cm por caja o por réplica de medio de cultivo líquido, los cuales se incubaron a 25°C temperatura ambiente.

Al realizarse la comparación contra el método tradicional de propagación (inóculo) y el método de homogenización donde se observó que la CP-43 y la CP-57 obtuvieron un mayor crecimiento por el método tradicional, en el caso de la cepa CP-99 se pudo observar un buen crecimiento en ambos métodos, por otro lado la cepa CP-123 presentó una mejor respuesta en el método tradicional mientras que por el método de homogenización se observó un crecimiento lento, pero logra invadir toda la caja. La CP-500 que es una de las cepas de lento crecimiento al igual que la CP-502, CP-503, CP-504, CP-505 y la CP-560 se observó un mayor crecimiento por el método de homogenización, aunque en un principio el crecimiento por inóculo fue el que obtuvo mayor respuesta. Sin embargo, la homogenización da pauta a que la CP-500 logró un crecimiento de mayor dimensión, por el método de inóculo convencional no logró obtener. Mientras la CP-501, CP-502, CP-503, CP-504, CP-505 y CP-560 siendo cepas de lento crecimiento, presentan un buen crecimiento por el método de homogenización, recordando que en estas se observó un crecimiento visible hasta los 20 días de su siembra.

### **Descripción al microscopio de material de homogenización a los 6 días de crecimiento**

En esta parte del trabajo se observó el crecimiento de las cepas a los 6 días de la siembra, por medio del microscopio. En el **Cuadro 18** se describen las

características que presenta la CP-43 a los 6 días de la siembra por homogenización en medio de cultivo CYM a diferentes pH, en la cual se pudo observar que el mejor crecimiento se presentó en el medio de cultivo CYM de referencia el cual no tuvo ningún tipo de modificación en su pH original, el micelio presentó un crecimiento abundante, a diferencia de los tratamientos con pH 5, 6 y 7 en los que el crecimiento fue muy poco.

**Cuadro 18.** Caracterización a microscopio de la CP-43 (*Agaricus bitorquis*) en medio de cultivo CYM sólido con la variable de pH (5, 6 y 7).

pH	Observaciones
5	Poco crecimiento micelial, micelio corto
6	Poco crecimiento , micelio corto
7	Poco crecimiento, se observa un aglomerado con crecimiento regular
6.7	Crecimiento abundante, micelio largos , medianos y cortos

El **Cuadro 19** describe las características que presentaron las cepas CP-57, CP-99 y CP-123 sembradas por homogenización en medio de cultivo CYM, donde se observó que la CP-57 presentó un crecimiento nulo en comparación con las cepas CP-99 y CP-123, las cuales obtuvieron un crecimiento regular en ambos casos, con la diferencia de las características de las hifas, ya que en la CP-123 se observaron hifas largas y cortas. Todo lo contrario de la CP-99, por mostrar crecimiento medio.

**Cuadro 19.** Características de las cepas de *Agaricus* en medio de cultivo CYM sólido inoculada por homogenización.

Cepa	Observaciones
CP-57	Crecimiento nulo.
CP-99	Crecimiento regular, micelio mediano.
CP-123	Crecimiento regular, hifas largas y cortas.

El **Cuadro 20** muestra las características de la CP-500 en CYM a diferentes pH (5, 6 y 7) sembrados por homogenización, donde se observó que el pH 5 y 7 tuvo poco crecimiento con presencia de hifas cortas a comparación de pH 6 que presentó un crecimiento regular.

**Cuadro 20.** Características de la CP-500 de *Agaricus* spp. en medio de cultivo CYM sólido inoculada por homogenización.

pH	Observaciones
6.7	Crecimiento regular, hifas largas y cortas
5	Poco crecimiento, hifas cortas
6	Crecimiento regular, hifas cortas y medianas
7	Poco crecimiento, hifas cortas

En las cepas CP-501, CP-502, CP-503, CP-505 y CP-560 fueron sembradas por el método de homogenización en medio de cultivo CYM, en donde fueron valoradas por medio del crecimiento micelial, con apoyo del microscopio donde se observó que la cepa CP-501, CP-502 y CP-503 presentaron un crecimiento regular con hifas y en el caso de la CP-505 y CP-560 obtuvieron menor crecimiento (**Cuadro 21**).

**Cuadro 21.** Características de crecimiento micelial en medio de cultivo CYM sólido inoculadas por homogenización de las cepas CP-501, CP-502, CP-503, CP-505, CP-560 de *Agaricus* spp.

Cepa	Observaciones
CP-501	Crecimiento regular, hifas cortas
CP-502	Crecimiento regular, hifas cortas
CP-503	Crecimiento regular, hifas cortas
CP-560	Poco crecimiento, hifas muy cortas
CP-505	Poco crecimiento, hifas muy cortas

El **Cuadro 22** muestra la velocidad de crecimiento de las cepas CP-43, CP-57, CP-99, CP-123, CP-500- CP-505, y CP-560 las cuales se sembraron en medio de cultivo CYM por el método tradicional (inóculo). A los 15 días se midió el crecimiento de cada una de las cepas en estudio, en las que se observó un alto crecimiento en la cepa CP-43 mientras que en las cepas CP-57 y CP-99 mostraron crecimientos regulares, en el caso de las cepas CP-123, CP-500, ICP-502, y CP-505, no mostraron crecimiento durante los 15 días a partir de la siembra.

**Cuadro 22.** Velocidad de crecimiento a los 15 días después de la inoculación de diferentes cepas de *Agaricus* spp.

Cepa	Medida (cm)
CP-43	1.7 x 1.6
CP-57	1.2 x 1.0
CP-99	1.0 x 1.0
CP-123	0.6 x 0.5
CP-500	0.6 x 0.4
CP-501	NP
CP-502	0.4 x 0.4
CP-503	NP
CP-560	NP
CP-504	NP
CP-505	0.5 x 0.4

NP = No aplica

### Anexo 3

#### Efecto de pH

Para la obtención del pH se colocó un inoculó de 5 mm de agar en una caja de Petri, el medio de cultivo es ajustado a un pH de 5, 6 y 7 con la adición de NaOH o HCl y se incubó durante 20 días a 25°C. La medición se realizó de la misma forma que el método anterior.

El **Cuadro 23** muestra el comportamiento de la CP-43 y CP-500 en medio de cultivo CYM sólido en pH 5, 6 y 7, y sembrados por el método de homogenización, para la obtención de datos se tomaron en cuenta el número de colonias, diámetro, color, textura y densidad. Con todos los datos anteriores se observó que la CP-43 tiene mayor crecimiento en pH 6 por el diámetro de la colonia y su colonización, así bien, en pH 5 y 7 no favorece su crecimiento. De la misma manera la cepa CP-500 crece mejor en pH 6 a diferencia del pH 7 donde el crecimiento es muy poco ó casi nulo.

**Cuadro 23.** Velocidad de crecimiento de la CP-43 (*Agaricus bitorquis*) y CP-500 (*Agaricus* spp.) en medio de cultivo CYM sólido a los 29 días de incubación.

Cepa	pH	Diámetro de col.	Color	Textura	Densidad
CP-43	6.7	1.7 x 1.8 - 0.8 x 1.3	Blanco	Lanoso	Escasa
	5	1.0 x 1.9 - 2.8 x 2.5	Blanco	Lanoso	Regular
	6	1.6 x 1.8 – 3.2 x 2.8	Blanco	Lanoso	Escaso
	7	0.9 x 1.6 – 2.5 x 3.0	Blanco	Lanoso	Escaso
CP-500	6.7	0.4 x 0.3 - 1.7 x 0.9	Crema	Lanoso	Escaso
	5	0.4 x 0.5 – 1.3 x 0.9	Crema	Lanoso	Escaso
	6	0.8 x 0.7 x 1.5 x 1.3	Crema	Lanoso	Regular
	7	0.3 x 0.4 – 1.0 x 1.2	Crema	Lanoso	Regular

En el **Cuadro 24** se muestran las características de la cepa CP-500 en medio de cultivo CYM a diferentes pH (5, 6 y 7) sembrados por el método de homogenización, donde se observó que en los pH 5 y 7 tuvieron poco crecimiento con presencia de hifas cortas a comparación de los pH 6 y el de referencia que presentaron un crecimiento regular.

**Cuadro 24.** Características de la CP-500 de *Agaricus* spp. en medio de cultivo CYM sólido inoculada por homogenización.

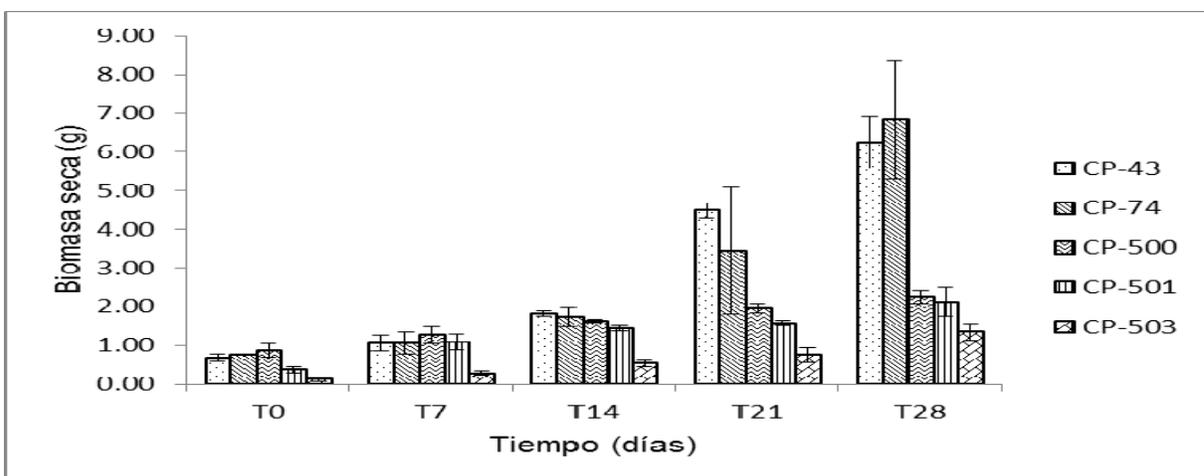
pH	Observaciones
6.7	Crecimiento regular, hifas largas y cortas
5	Poco crecimiento, hifas cortas
6	Crecimiento regular, hifas cortas y medianas
7	Poco crecimiento, hifas cortas

## Anexo 4

### Cinética de cultivo

La cinética de cultivo se obtuvo a partir de la biomasa, para lo que se utilizaron 5 tubos de medio de cultivo CYM líquido, los cuales se inocularon por el método de homogenización y fueron monitoreados cada 72 hrs, con lo que se obtuvieron la biomasa generada en cada periodo de tiempo, esto se realizó por filtración al vacío, para lo que se necesitaron circunferencias de papel filtro Whatman que se tararon a 80°C por 24 hrs, además de haber estado en el desecador por 1 hora. El papel filtro se colocó en el embudo Buchner al cual se le agregó el medio de cultivo con el crecimiento de las cepas en estudio. Se filtraron al vacío donde se recuperó la biomasa, esta se puso a secar o deshidratar en el horno a 40°C por 24 hrs, después de transcurrido ese tiempo se colocó en el desecador por 1 hr y se pesó, para obtener la biomasa total se le restó el peso inicial del papel filtro.

La **Figura 41** muestra la cinética de crecimiento obtenida a partir de la biomasa durante 28 días de crecimiento en medio de cultivo CYM líquido, en la cual se observó que la CP-74 fue la que generó mayor biomasa, seguida de la CP-43, la que generó poca biomasa fue la CP-503. Sin embargo, las CP-500 y la CP-501 no lograron un crecimiento competitivo con la CP-43 y CP-74.



T0= tiempo cero. T7=tiempo siete. T14=tiempo catorce. T21= tiempo veinte uno. T28= tiempo veinte ocho

**Figura 41.** Cinética de crecimiento de las cepas de *Agaricus* spp. en un periodo de incubación de 28 días de las cepas CP-43, CP-74, CP-500 y CP-501.

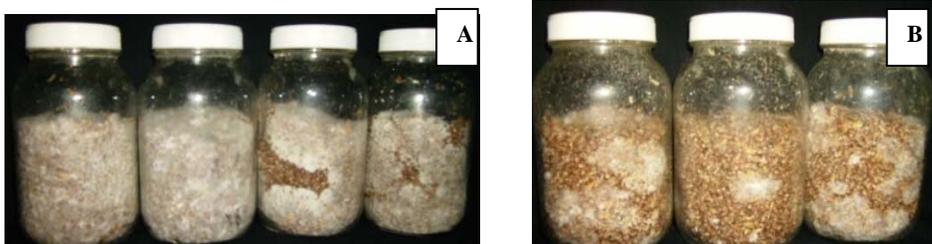
## Anexo 5

### Obtención del inculó por homogenización en trigo

Siguiendo la metodología propuesta por Martínez-Carrera y Morales (1988), la cual consistió en hidratar 4.5 kg de trigo en agua caliente por 20 minutos, y dejándose reposar otros 20 minutos, una vez pasando el tiempo se drenaron. Se prepararon frascos de 150 mL de capacidad con 100 g de trigo por cada cepa, se esterilizó en autoclave a 121°C y 15 lb/in<sup>2</sup> de presión durante 60 minutos. El material ya frío se inoculó por el método de homogenización para el cual se utilizan 3 inculós de 0.5 cm por mililitro de agua destilada la cual se homogenizó a 11030 rpm por un minuto y cincuenta segundos, de este homogenizado se inocularon los frascos con 250 µl, y posteriormente se cerraron los frascos procurando que las tapas quedaran parcialmente abiertas para facilitar la aeración. Se rotularon los frascos con una etiqueta anotando el número de la cepa empleada y la fecha de siembra. Se incubaron a 25°C. Al transcurso de un mes se tomaron algunas variables como; porcentaje de crecimiento, densidad, textura y color (Figura 42).

**Cuadro 25.** Colonización y características de las cepas CP-43 y CP-57 (*Agaricus*) en masters sin cal: yeso al mes de incubación.

Cepa	Colonización (%)	Color	Textura	Densidad
CP-43	75 - 99	Blanco	Lanoso	Abundante
CP57	15 - 45	Blanco	Lanoso	Regular



**Figura 42.** Colonización de las cepas CP-43 y CP-57 (*Agaricus*) en masters sin cal: yeso al mes de incubación.

## **Anexo 6**

### **Propagación de trigo**

#### **Tratamiento con cal y yeso**

La preparación se desarrolló siguiendo la metodología propuesta por Martínez-Carrera y Morales (1988), la cual consistió en hidratar 4.5 kg de trigo en agua caliente por 20 minutos, se dejó reposar por otros 20 minutos, una vez drenado se le agregó una concentración 1:4 de cal y yeso. Se prepararon frascos de boca ancha de 940 mL de capacidad con 600 g de trigo por cada cepa, se esterilizaron en autoclave a 121°C y 15 lb/in<sup>2</sup> de presión durante 60 minutos. El material ya frío se inoculó con el micelio obtenido de los frascos de 150 mL y posteriormente se cerraron los frascos procurando que las tapas quedaran parcialmente abiertas para facilitar la aeración. Se rotularon los frascos con una etiqueta anotando el número de la cepa empleada y la fecha de siembra. Después, los frascos se acomodaron en un estante. La incubación de la “semilla” se hizo en condiciones de laboratorio, a una temperatura de 22-26°C. Una vez que los frascos estuvieron colonizados, la “semilla” se utilizó para sembrar la composta. Esta producción de semilla-inoculó requiere de constante monitoreo del crecimiento del micelio del hongo para encontrar contaminación.

#### **Tratamiento sin cal y yeso**

La preparación se desarrolló siguiendo la metodología propuesta por Martínez-Carrera y Morales (1988), la cual consistió en hidratar 4.5 kg de trigo en agua caliente por 20 minutos, se dejó reposar por otros 20 minutos, una vez drenado se prepararon frascos de boca ancha de 940 mL de capacidad con 600 g de trigo por cada cepa, se esterilizó en autoclave a 121°C y 15 lb/in<sup>2</sup> de presión durante 60 minutos. El material ya frío se inoculó con el micelio obtenido de los frascos de 150 mL y posteriormente se cerraron los frascos procurando que las tapas queden parcialmente abiertas para facilitar la aeración. Se rotularon los frascos con una etiqueta anotando el número de la cepa empleada y la fecha de siembra. Después, los frascos se acomodaron en un estante. La incubación de la “semilla” se hizo en condiciones de laboratorio, a una temperatura de 22-26°C. Una vez que

los frascos estuvieron colonizados, la “semilla” se utilizó para sembrar la composta. Esta producción de semilla-inoculó requiere de constante monitoreo del crecimiento del micelio del hongo para encontrar contaminación.

**Cuadro 26.** Colonización y características del micelio de los masters de las cepas de *Agaricus* spp. en relación a la proporción de cal: yeso a los 27 días de incubación.

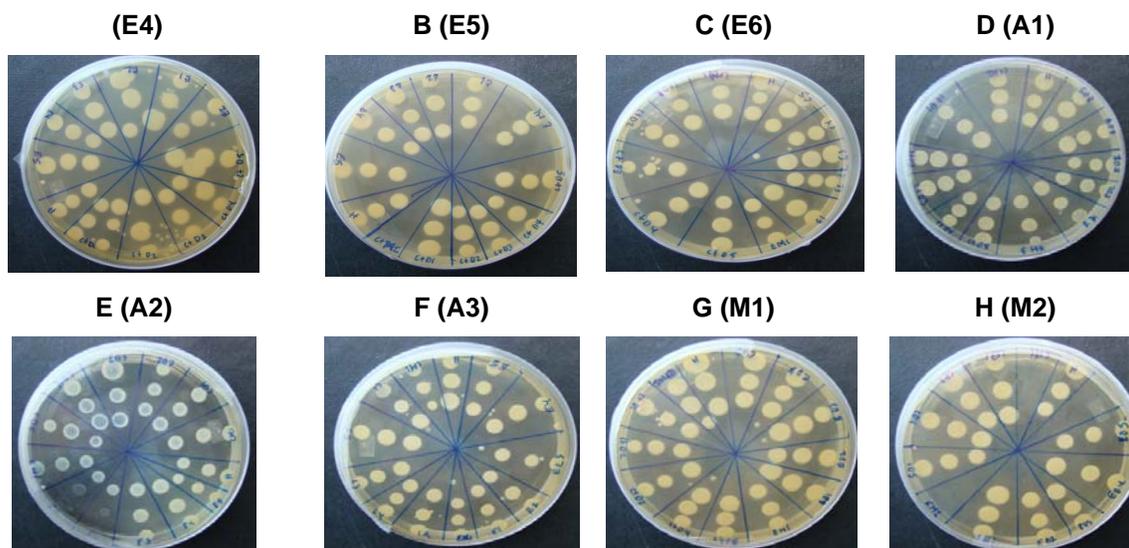
Cepa	Relación de yeso y cal (g)	Colonización (%)	Textura	Color	Densidad
CP-43	0	100	Lanoso	Blanco	Regular
	2.5:10	85- 100	Lanoso	Blanco	Abundante
	5:20	100	Lanoso	Blanco	Abundante
CP-57	0	60 -85	Lanoso	Blanco	Regular
	2.5:10	5- 25	Lanoso	Blanco	Abundante
	5:20	30 -45	Lanoso	Blanco	Abundante
CP-99	0	5 – 10	Lanoso	Blanco	Regular
	2.5:10	3 – 5	Lanoso	Blanco	Regular
	5:20	1 -5	Lanoso	Blanco	Escaso
CP-123	0	20- 30	Lanoso	Crema	Abundante
	2.5:10	0	NP	NP	NP
	5:20	0	NP	NP	NP
CP-500	0	10- 15	Lanoso	Crema	Abundante
	2.5:10	2- 3	Lanoso	Crema	Regular
	5:20	2- 5	Lanoso	Crema	Regular
CP-501	0	45-60	Lanoso	blanco	Regular
	2.5:10	0	NP	NP	NP
	5:20	1	Lanoso	Blanco	Escaso
CP-502	0	85-99	Lanoso	Crema	Abundante
	2.5:10	10- 20	Lanoso	Crema	Abundante
	5:20	5- 10	Lanoso	Crema	Abundante
CP-503	0	100	Lanoso	Crema	Abundante
	2.5:10	30- 40	Lanoso	Crema	Abundante
	5:20	5- 15	Lanoso	Crema	Regular
CP-560	0	80 – 95	Lanoso	Crema	Regular
	2.5:10	10- 20	Lanoso	Crema	Regular
	5:20	5- 10	Lanoso	Crema	Abundante
CP-504	0	70- 75	Lanoso	Crema	Regular
	2.5:10	10- 15	Lanoso	Crema	Regular
	5:20	5 – 10	Lanoso	Crema	Abundante
CP-505	0	70 – 75	Lanoso	Crema	Regular
	2.5:10	10 – 15	Lanoso	Crema	Regular
	5:20	5 – 10	Lanoso	Crema	Abundante

## Anexo 7

### Prueba de sensibilidad

Se prepararon cajas de Petri de medio Muller Hinton. Este medio se preparó pesando 38 g en 1 L de agua destilada, el cual se licuó y se esterilizó a 125°C por 25 min. Posteriormente, se vertió en cajas de Petri y se incubaron las cajas durante 24 horas a 35°C como prueba de esterilización. De cada una de los extractos y de las diluciones que se obtuvieron de las microplacas se tomó una muestra y fue colocada en el medio de cultivo, para ser incubado a 35°C por 24 horas.

En la **Figura 43** se muestra que el crecimiento de la bacteria se debilitó a las 24 horas de estar en contacto con el extracto de la CP-89 (**Figura 43A2**). Se observó que los extractos acuosos tuvieron un mayor control sobre *E. coli*, a diferencia de los extractos etanólicos o los mismos macerados.



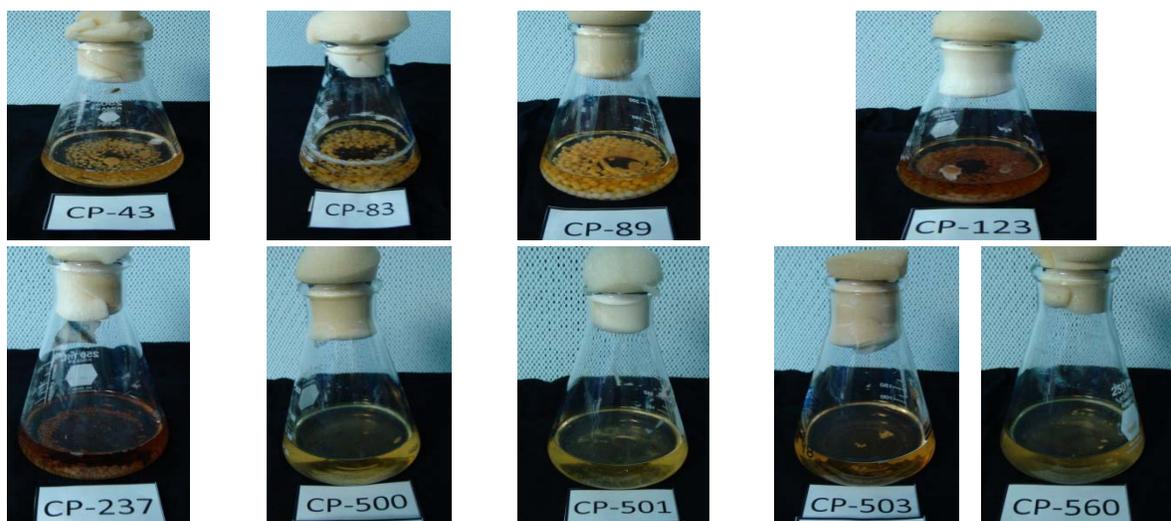
**Figura 43.** Prueba de sensibilidad de la CP-89 (*Agaricus* spp.) contra la cepa bacteriana *E. coli* (CPB-8).

## Anexo 8

### Obtención de micelio con agitación (120 rpm) y sin agitación

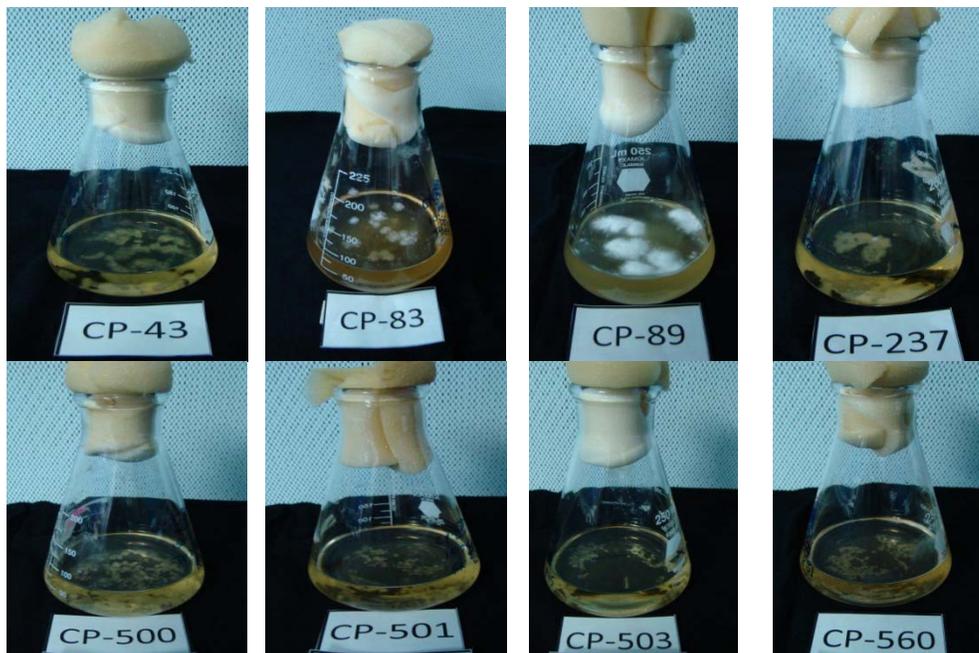
Se realizó a través del crecimiento en medio de cultivo líquido (CYM) y se resembró por homogenización, de donde se obtuvo la biomasa por medio de filtración al vacío, el contenido (biomasa micelial + CYM) de los matraces experimentales se vertieron en papel filtro Whatman No.1 (esterilizado, secado a 80°C, y prepesado), ajustado a un embudo en matraz de Kitazato al vacío. La biomasa micelial obtenida sobre el papel filtro se pesó, se secó a 40°C, y se pesó nuevamente a las 24 hrs de secado para la obtener el rendimiento de la biomasa.

Como se muestra en la **Figura 44**, el crecimiento del micelio con agitación a 120 rpm forma pellets que van de 0.5 cm - 3 cm de diámetro, con excepción de las cepas CP-500, CP-501, CP-503 y CP-560 en las cuales se observó un crecimiento muy escaso a comparación de las cepas CP-43, CP-83, CP-89, CP-123 y CP-237. Sin embargo, las cepas CP-83 y CP-89 fueron las que mostraron un mayor crecimiento y diámetro en los pellets, a los 28 días a temperatura ambiente.



**Figura 44.** Crecimiento micelial por homogenización e incubación con agitación a 120 rpm de las cepas de *Agaricus* spp. (CP-43, CP-83, CP- 89, CP-123, CP-237, CP-500, CP-501, CP-503, CP-560) Tiempo de incubación 28 días.

El crecimiento micelial en forma estática mostró que el micelio creció tanto en la superficie como sumergido, en este caso no muestra formación de pellets, sino un crecimiento superficial abundante en algunos casos, como lo fueran las cepas CP-83 y CP-89, además que la CP-500, CP-501, CP-503 y CP-560 presentaron mayor crecimiento y densidad (**Figura 45**).



**Figura 45.** Crecimiento micelial por homogenización e incubación sin agitación de las cepas de *Agaricus* spp. (CP-43, CP-83, CP- 89, CP-123, CP-237, CP-500, CP-501, CP-503, CP-560) Tiempo de incubación 28 días.