



CONTROL DE CONTAMINANTES DURANTE EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE HONGOS COMESTIBLES

Marcela Viviana Filippi^{1,2,3}, Florencia Cayolo^{1,3}, Jorge Federico Maldonado^{1,3}, Daniel Alfredo Martínez^{1,3}, María Belén Buglione^{1,3}.

¹Universidad Nacional de Río Negro (Escuela de Medicina Veterinaria y Producción Agroindustrial), Choele Choel, Río Negro. ²Universidad Nacional de Río Negro (Escuela de Producción, Tecnología y Medio Ambiente), Villa Regina, Río Negro. ³CIT-RIO NEGRO, CONICET-UNRN.

RESUMEN

Los hongos ostras *Pleurotus ostreatus* conocidos también como gírgolas, son muy apreciados debido a su alto valor nutricional, sus propiedades nutraceuticas y su particular flavor. Debido a que desarrollan en materiales lignocelulósicos, son cultivados en todo el mundo sobre una diversidad de sustratos orgánicos, como pajas y orujos provenientes de residuos de actividades agroindustriales. Sin embargo, el cultivo intensivo de hongos comestibles puede ser afectado por algunas enfermedades fúngicas y bacterianas, que causan pérdidas en la producción. En efecto, aunque la manipulación sea cuidadosa y con medidas higiénico-sanitarias extremas en el proceso de producción, puede haber contaminaciones por distintos microorganismos muy difíciles de controlar. Antes del desarrollo del micelio o en la etapa de fructificación, pueden presentarse microorganismos competitivos en el sustrato, como *Trichoderma spp.* que deben ser disminuidos o eliminados. Se han descrito hasta el presente, distintas metodologías de control de microorganismos: i) esterilización, ii) pasteurización, iii) tratamiento con agua caliente, iv) fermentación del sustrato, v) tratamiento químico.

Debido a que en ensayos previos se observó que el proceso de esterilización en autoclave del sustrato resultó insuficiente para lograr la fructificación de gírgolas sin contaminaciones ya que apareció moho verde junto al micelio blanco característico de *Pleurotus*, se decidió probar la combinación de distintos tipos de tratamientos para controlar la contaminación durante la producción de gírgolas. Así, la esterilización del sustrato con vapor de agua a presiones altas, fue seguida por un tratamiento químico con ácido peracético activo. Este compuesto ($C_2H_4O_3$) resulta de la combinación de ácido

acético con peróxido de hidrógeno y actúa como un agente sanitizante, biocida de acción rápida, produciendo la lisis celular al provocar la oxidación de las membranas plasmáticas. Además, es factible su utilización en la industria alimentaria porque no resulta tóxico (ya que se degrada a ácido acético y peróxido de hidrógeno) ni cambia las propiedades organolépticas de los alimentos.

Se trabajó con el orujo proveniente de industrias elaboradoras de jugo concentrado de pera y manzana de la zona Alto Valle de la provincia de Río Negro. Éste se esterilizó, envasado en bolsas de polipropileno, en autoclave a 1,2 atm durante 60 min. Luego, el sustrato se inoculó en forma estéril con *P. ostreatus* en una proporción 1/10. En paralelo, para controlar contaminaciones posteriores, tanto la cámara de incubación como las bolsas y lugares de apoyo fueron tratadas con ácido peracético al 5%, aplicado con un atomizador manual.

Dado que sumando el uso de ácido acético activo al proceso de esterilización térmica del sustrato inicial se logró cosechar gírgolas libres de contaminantes, se concluye que la combinación de estos dos tratamientos es efectiva para asegurar el control de contaminantes durante el proceso completo de producción de *P. ostreatus*.

Introducción

Entre los hongos comestibles cultivados alrededor del mundo con alta producción están los *Agaricus biosporus* (J.E. Lange), *Imbach* (Agaricaceae), familia de los Champiñones, y *Pleurotus ostreatus* (Jacq) P. Kumm, Familia de las gírgolas (Index Fungorum, 2019, Royse, 2014, Anaid Talavera-Ortiz, 2019).

Los hongos comestibles del género *Pleurotus* spp., se caracterizan por crecer fácilmente en diversos sustratos y condiciones climáticas (Rodríguez et al., 2018; Dayro, 2016, Al-Momany y Ananbeh, 2011), así en el presente trabajo se hace desarrollar este hongo sobre orujo de manzana proveniente de la industria de producción de jugo concentrado de pera y manzana y producción de sidra. Si bien estos orujos permiten la producción de este tipo de hongos, esto incide también en el crecimiento de hongos competidores que disminuyen la productividad del cultivo (Dayro, 2016).

Tanto las especies de *Pleurotus* como de Champiñones pueden presentar enfermedades y contaminantes tales como hongos verdes causados por *Trichoderma Pers.* (Hypocreaceae) (Oei, 1991), moho rojo por *Neurospora sp.* (Sordariaceae) y parche

marrón por *Pseudomonas tolaassi* Paine, así como algunos virus (Kim et al., 1995; 2000). Las enfermedades generadas por los hongos del género *Trichoderma* son difíciles de distinguir, porque en un cultivo del género *Pleurotus* (Fr.) P. Kumm. (Pleurotaceae), ambos micelios tienen características similares, entonces la infección es detectable después de dos semanas, y se vuelve verde debido a la gran esporulación (Danesh et al., 2000), causando la inhibición del crecimiento del *Pleurotus* porque compiten por la especie y los nutrientes.

La estrategia del *Trichoderma* es la secreción de enzimas hidrolíticas, tales como sintetetasas, β -glucanasas y celulasas, las cuales rompen la pared celular del micelio de *Pleurotus* (Goltapeh and Danesh, 2000), inhibiendo la formación de los cuerpos fructíferos (Beyer et al., 2000).

Se estima que la *Trichoderma*, junto con el virus X del hongo (MVX) -es una enfermedad relativamente nueva que afecta la producción comercial de hongos-, han causado el 25% de las pérdidas de producción del cultivo de hongos comestibles (Soković and van Griensven, 2006; Sobieralski et al., 2012, Anaid Talavera-Ortiz, 2019).

Se han utilizado alternativas biológicas para el control de este tipo de contaminantes en el cultivo de *Pleurotus spp*, entre ellas el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* L., que demostró una inhibición de los hongos *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *Alternaria alternata*, *Penicillium citrinum*, *Curvularia lunata* y *Trichoderma harzianum*, a concentraciones mayores a 1500 ppm en ensayos in-vitro (Mahanta et al., 2007). En otro estudio fueron evaluados ocho extractos en etanol en pruebas in-vitro para *Azadiracta indica*, *Allium sativum*, *Artemesia indica*, *Urtica dioeca*, *Lycopersicon esculentum*, *Datura stramonium*, *Mentha spicata* y *Juglans regia* obteniéndose hasta 52% de inhibición de *Trichoderma harzianum* con el extracto de *Juglans regia*; sin embargo estos extractos también generaron un efecto inhibitorio en el micelio de *Pleurotus spp*. (Shah et.al, 2011). El extracto en metanol de la resina de *Asafoetida oleogum* a concentración entre 0.65 y 1.25 $\mu\text{g/L}$, también permitió detener la proliferación de *Trichoderma harzianum*, en un trabajo in-vitro con *Pleurotus eryngii* (Angelini et al., 2009). También se han evaluado fungicidas como Carbendazim, Bitertanol, Hexaconazol, Captan y Mancozeb en el control de *Trichoderma harzianum*. El fungicida que presentó mejores resultados fue Carbendazim con una inhibición del 91%; sin embargo también generó una inhibición de 25 % en *Pleurotus sajor-caju*,

aunque fue menos agresivo que otros fungicidas evaluados, en donde la inhibición del hongo comestible fue de hasta 87% (Shah, et al., 2011).

Por otro lado, ciertos tratamientos físicos como la esterilización a 121 °C, agua caliente a 60 °C y agua alcalina con inmersión mayor a 36h, han mostrado que limitan el crecimiento *Trichoderma spp.* al ser evaluados en el sustrato para el cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Colavolpe, et al., 2014; Contreras, et al., 2004; Oseni, et al., 2012). Como puede evidenciarse en los trabajos expuestos, aún quedan interrogantes sobre el control más adecuado de hongos competidores en el proceso de obtención de *Pleurotus spp.*, que se ajusten a las necesidades y condiciones ambientales particulares. Por este motivo en el presente trabajo se evaluó la eficiencia de tratamientos físicos, para el control de hongos competidores, durante la obtención de cepa comercial de *Pleurotus spp* sumado a un tratamiento químico, con el agregado de ácido peracético, PAA (C₂H₄O₃), que resulta de la combinación de ácido acético con peróxido de hidrógeno y actúa como un agente sanitizante, biocida de acción rápida, produciendo la lisis celular al provocar la oxidación de las membranas plasmáticas. La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) describe al ácido peracético como un antimicrobiano ideal, debido a su alto potencial oxidante sobre la membrana externa de las bacterias, endosporas, hongos, virus y levaduras. Su mecanismo de oxidación consiste en la transferencia de electrones de la forma oxidada del ácido a los microorganismos, provocando así su inactivación o incluso su muerte. Además, es factible su utilización en la industria alimentaria porque no resulta tóxico (ya que se degrada a ácido acético y peróxido de hidrógeno) ni cambia las propiedades organolépticas de los alimentos.

Materiales y métodos

ENSAYO 1

Sustrato: Constituido por orujo de manzana proveniente de una industria de jugos concentrados del Alto Valle de Río Negro. Se seca el mismo a temperatura y humedad ambiente. Luego se toma una parte de éste y se humedece durante 24 horas con agua destilada, hasta un 80%. Se separan de a 500g, colocando en bolsas transparentes resistentes a la temperatura. Se cierran y se esterilizan en autoclave a 1,2 atm durante 60 min.

Una vez que se enfría la muestra se procede a la inoculación primaria fúngica (con semilla previamente inoculada).

Material Fúngico: Se utilizó como inóculo, en una relación 1/10 p/p, semillas de girasol cubiertas con la cepa F01 de *Pleurotus ostreatus*, proveniente de CERZOS-CONICET (Bahía Blanca).

Condiciones de incubación: para la fase vegetativa, los sustratos inoculados y embolsados se conservaron en oscuridad a $28 \pm 1^\circ\text{C}$.

Fructificación: La fructificación se llevó a cabo en las mismas bolsas, agujereadas, en una cámara en la cual se controlaron las siguientes condiciones: humedad (80%), temperatura ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) y luz (600 lux a 1m del piso) alternando con oscuridad cada 12 horas

ENSAYO 2

Se trabajó de la misma manera descrita para el ENSAYO 1 pero se agregó el tratamiento con una solución sanitizante de ácido peracético al sustrato, material fúngico y ambientes de incubación en fase vegetativa y fructificación.

Solución sanitizante: Se utilizó ácido peracético al 5% v/v en agua destilada, que fue preparado en un rociador manual. El uso de este ácido está aprobado para emplearse en la industria alimenticia ya que se degrada formando metabolitos no tóxicos.

Se esterilizó el sustrato de la forma en que se detalló para ENSAYO 1 y una vez que se enfrió el material, se inoculó con las semillas del micelio y se roció del lado de afuera de las bolsas con la solución del ácido peracético al 5%.

En la estufa de incubación micelial y en la cámara de fructificación se realizó una limpieza agua clorada (utilizando hidro lavadora) en techos, puertas y paredes. Se dejó secar y se le colocó por medio de aspersion, una solución con PAA, aplicado con un atomizador manual.

Resultados y discusión

En el ENSAYO 1, al término de diez días se vieron en el sustrato, además del micelio blanco producido típicamente por *P.ostreatus*, manchas verdes (Figura 1).



Figura 1: fotografía de una bolsa de orujo inoculado, mostrando contaminación.

Al fructificar, se vio que *Trichoderma* invade todo el sustrato y los frutos de gírgolas son muy pequeños y son poco carnosos, además aparecen otros contaminantes de color naranja, como puede observarse en la Figura 2.



Figura 2: Escaso desarrollo de cuerpos fructíferos de *P.ostreatus*. Contaminantes invaden el sustrato.

En el ENSAYO 2, el uso de una solución con ácido peracético al 5% resultó fundamental. Al finalizar el proceso, luego de un mes se obtiene una producción abundante de gírgolas de *Pleurotus ostreatus*, frutos de buena calidad y sin presencia de *Trichoderma* (Fig 3).



Figura 3: Frutos de *P.ostreatus* sin contaminación.

Conclusiones

Deben implementarse protocolos que contemplen factores con el fin de alcanzar el mayor grado de higiene posible que garantice la sanidad de todos los puntos de la cadena productiva de las gírgolas, De acuerdo a los resultados obtenidos, se concluye que el tratamiento químico con solución de ácido paracético en la concentración utilizada, es un agente necesario para asegurar la producción de gírgolas sin contaminación. El autoclavado del sustrato no es suficiente. Por lo que el uso de PAA sumado al tratamiento térmico inicial, resultan efectivos para asegurar el control de contaminantes durante el proceso completo de producción de *P. ostreatus* sobre orujo de manzana.

Se determinó que el PAA presenta una alta actividad como biocida y sanitizante, de fácil manejo y comodidad operativa, de fácil dilución, no espumígeno, no corrosivo y que no genera vapores tóxicos.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por el Consejo de Investigación, Desarrollo y Transferencia de Tecnología de la UNRN, PI 40-A-614. Los autores agradecen a la empresa JUGOS S.A. por la provisión del orujo empleado en los ensayos.

Referencias

- Al-Momany A & Ananbeh K. (2011). Conversion of agricultural wastes into value added product with high protein content by growing *Pleurotus ostreatus*. *Survival and Sustainability, Environmental Earth Sciences*. pp. 1483-1490.
- Anaid Talavera-Ortiz, Priscila Chaverri , Gerardo Díaz-Godínez, Ma. de Lourdes Acosta-Urdapilleta, Elba Villegas, Maura Téllez-Téllez. 2019. Mycelial inhibition of *Trichoderma* spp. (Hypocreaceae) isolated from the cultivation of *Pleurotus ostreatus* (Pleurotaceae) with an extract of *Pycnoporus* sp. (Polyporaceae). *Acta botánica Mexicana*. 127: e1537 | 2020 |10.21829/abm127.2020.1537
- Angelini, P., Pagiotti, R., Venanzoni, R. y Granetti, B. 2009. Antifungal and allelopathic effects of *Asafoetida* against *Trichoderma harzianum* and *Pleurotus* spp. *Allelopathy Journal* 23 (2): 357-368
- Beyer, D. M., P. J. Wuest and J. J. Kremser. 2000. Evaluation of epidemiological factors and mushroom substrate characteristics influencing the occurrence and development of *Trichoderma* green mold. In: Van Griensven, L. J. L. D. (ed.). *Science and Cultivation of Edible Fungi*. CRC Press. Maastricht, Netherlands. Pp.
- Colavolpe, M. B., Mejia, S. J., y Alberto, E. 2014. Efficiency of treatments for controlling *Trichoderma* spp during spawning in cultivation of lignicolous mushrooms *Braz J Microbiol.* 45(4): 1263-1270.
- Contreras, E. P., Sokolov, M., Mejía, G., y Sánchez, J. E. 2004. Soaking of substrate in alkaline water as a pretreatment for the cultivation of *Pleurotus ostreatus*. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 79(2): 234-240.
- Danesh, Y. R., E. M. Goltapeh and H. Rohani. 2000. Identification of *Trichoderma* species causing green mold in button mushroom farms, distribution and their relative abundance. In: Van Griensven L. J. L. D. (ed.). *Science and Cultivation of Edible Fungi*. CRC Press. Maastricht, Netherland. Pp. 653-659.
- Dayro, G. B. @LIMENTECH CIENCIA Y TECNOLOGÍA ALIMENTARIA ISSN 1692-7125. Volumen 14 No. 1, p. 27 - 37 año 2016 Facultad de Ingenierías y Arquitectura Universidad de Pamplona
- Goltapeh, E. M. and y. Danesh. R. 2000. Studies on interaction between *Trichoderma* species and *Agaricus bisporus* mycelium. In: Van Griensven, L. J. L. D. (ed.). *Science and Cultivation of Edible Fungi*. CRC Press. Maastricht, Netherlands. Pp. 661-666
- Index Fungorum. 2019. Index Fungorum database. <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp> (consulted March, 2019)
- Mahanta, J. J., Chutia, M., Bordoloi, M., Pathak, M. G., Adhikary, R. K., & Sarma, T. C. *Cymbopogon citratus* L. essential oil as a potential antifungal agent against key weed moulds of *Pleurotus* spp. spawns. (2007). *Flavour and Fragrance Journal*. 22(6): 525-530.
- Kim, J. W., S. Kwon and H. J. Kang. 1995. Studies on the pathogenic *Pseudomonas* causing bacterial disease of cultivated mushroom in Korea. *Korean Journal Plant Pathology* 11: 353-360
- Oei, P. 1991. *Manual on mushroom cultivation: techniques, species and opportunities for commercial application in developing countries*. TOOL Publications. Wageningen, Netherlands. 249 pp
- Oseni, T., Dlamini, S. O., Earnshaw, D. M., y Masarirambi, M. 2012. Effect of Substrate Pre-treatment Methods on Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) Production. *Int. J. Agric. Biol.* 14(2): 251-255.

Rodríguez, G.; Martínez, D; Buglione, M.B.; Filippi, M.; Agüero, M. (2018). Cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer sobre orujo de pera: Evaluación de la productividad y composición química del sustrato biodegradado *Anales de Biología*. 40: 21-30.

Royse, D. J. 2014. A global perspective on the high five: *Agaricus*, *Pleurotus*, *Lentinula*, *Auricularia* & *Flammulina*. In: Singh, M. (ed.). Proceedings of the 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP8). ICAR-Directorate of Mushroom Research. New Delhi, India. 639 pp

Shah, Sh., Nasreen, S. y Munshi N.A. 2011. Evaluation of Some Botanicals in Controlling Green Mold (*Trichoderma harzianum*) Disease in Oyster Mushroom Cultivation. *International Journal of Botany*. Volume 7 (3): 209-215, 2011

Sobieralski, K, Siwulski, M., Kommon-Żelazowska, M., Błaszczyk, L., Sas-Golak, I., Frużyńska-Józwiak, D. (2012) Impact of *Trichoderma pleurotum* and *T. Pleuroticola* isolates on yielding of *Pleurotus ostreatus* (fr.) Kumm. *Journal Of Plant Protection Research* Vol. 52, No. 1 DOI: 10.2478/v10045-012-0025-4

Soković, M. and L. J. van Griensven. 2006. Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. *European Journal of Plant Pathology* 116(3): 211-224. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10658-006-9053-0>