

# ESTABLECIMIENTO DE UN SUBSTRATO BASADO EN RESIDUOS DE *Cedrus sp.*, *Eucalito sp.* y *Pinus taeda* PARA EL CULTIVO DE *Ganoderma lucidum*.

Mauro<sup>1</sup> Quiñones Aguilar  
Universidad Ricardo Palma (URP)

Sandra Contreras<sup>1</sup>, Karina Garay<sup>1</sup>, Alonso Huayhua<sup>1</sup>  
Laboratorio de Biotecnología Ambiental. Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad Ricardo Palma

## RESUMEN

Los recursos naturales han constituido siempre las principales fuentes para el desarrollo de la economía de un país. Además, en los últimos años se ha logrado importante desarrollo en la tecnología, que ha traído como consecuencia una explotación cada vez mayor de dichos recurso y residuos forestales que contamina el ambiente; razón por el cual, se plantea desarrollar sistemas de biotransformación para minimizar los efectos negativos sobre el ambiente, mediada por *Ganoderma lucidum*, un Basidiomycete de la familia *Ganodermateaceae*, ampliamente reconocido por sus múltiples propiedades medicinales y nutraceuticas por siglos en China, Japón y Corea. Se logró establecer dos tipos de medio de cultivo que permiten subcultivar, multiplicar y conservar el micelio a 4°C. Convertir en semilla en trigo resbalado. Asimismo, se logró el desarrollo y fructificación de *G. lucidum* en residuos (aserrín) de la industria aserradora alto andina de eucalipto, pino y se descartó como sustrato el de cedro, donde no se alcanzó la colonización total del sustrato menos la fructificación.

**PALABRAS CLAVES:** residuo forestales, biotransformación, *Ganoderma lucidum*, aserrín, fructificación.

## ESTABLISHMENT OF A SUBSTRATE BASED ON RESIDUES OF *Cedrus sp.*, *Eucalito sp.* and *Pinus taeda* FOR THE CULTURE OF *Ganoderma lucidum*.

## ABSTRACT

Natural resources have always been the main sources for the development of a country's economy. In addition, in recent years there has been significant development in technology, which has resulted in an increasing exploitation of these resources and forest residues that pollute the environment. For this reason, it is proposed to develop biotransformation systems to minimize negative effects on the environment, mediated by *Ganoderma lucidum*, a Basidiomycete of the *Ganodermateaceae* family, widely recognized for its multiple medicinal and nutraceutical properties for centuries in China, Japan and Korea. It was possible to establish two types of culture medium that allow subculturing, multiplying and conserving the mycelium at 4 ° C. Turning seed into slipped wheat. Likewise, the development and fruiting of *G. lucidum* was,

achieved in residues (sawdust) of the high Andean sawdust industry of eucalyptus, pine and cedar was discarded as a substrate, where the total colonization of the substrate was not achieved, minus fruiting.

**Key Words:** forest residue, biotransformation, *Ganoderma lucidum*, sawdust, fruiting

## Introducción

El Perú es uno de los países mega-biodiverso, ocupa la segunda mayor superficie de bosques naturales en América Latina, con aproximadamente 69 millones de hectáreas, posicionándose en el cuarto lugar a nivel del continente americano y noveno a nivel mundial; de estos, el 94% se concentran en la región longitudinal de la selva. Cerca de 19 millones de hectáreas han sido clasificados como bosques de producción permanente para madera, de los cuales se aprovechan para la producción de madera cerca de 7.3 millones de hectáreas, aquí se producen anualmente alrededor de 2.1 millones de m<sup>3</sup> de madera rolliza que son transformadas en las industrias madereras, en tableros, laminas entre otras.

Los residuos provenientes de la industria maderera Postemsky, P.*et al.* (2015.), Melo, C. (2014). generan un gran impacto ambiental al contaminar los suelos, aire y agua; debido al desconocimiento y/o falta de tecnologías biológicas como biotransformación para convertir en un producto de alto valor económico en nuestro país. Los residuos de la industria maderera entre ellos el aserrín, por su alto contenido de carbono es uno de los componentes de gran importancia en la formulación de sustratos, para cultivo y producción de hongos de alto valor económico, en especial los de importancia medicinal y alimenticia como lo es *Ganoderma lucidum*.

*Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst conocido como “Reishi”, “Lingzhi” y Mushroom King” es un hongo medicinal de la familia Ganodermataceae Majid Azizi et al (2012), este hongo presenta una alta demanda por sus componentes bioactivos Lisiecka Jolanta, *et al.* (2015) de importancia medicinal y/o farmacológica por sus propiedades curativas. Además produce enzimas ligninolíticas como peroxidasas y lacasas que degradan principalmente la celulosa y la lignina de la madera (Wasser, 2005)

Razón por el cual, la investigación tiene como fin buscar la formulación de un sustrato basado en residuos (aserrín) de *Cedrus sp.* “Cedro”, *Eucalyptus sp.* “Eucalipto” y *Pinus taeda* “Pino” para cultivo y producción de *Ganoderma lucidum* en nuestro país.

## Materiales y Métodos

### Obtención y subcultivo del material biológico

El cultivo puro (cepa) de *Ganoderma lucidum*, fue adquirida de una empresa privada dedicada al cultivo de hongos comestibles. La cepa fue trasladada al Laboratorio de Biotecnología Ambiental de la FCB de la URP, donde se conservó a 4°C (Fig. 1), que luego fueron sub-cultivadas en placas Petri y tubos de ensayo (Fig. 2) en medios de cultivo agar Mosto de Cerveza (MBC) y agar Maltin Power.



Fig.1. Cepa Madre de *Ganoderma lucidum*



Fig.2. Sub-cultivo en Placa Petri y tubos de ensayo, al 2do día de siembra

### PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO Y SIEMBRA

Se prepararon dos tipos de medio de cultivo: Agar - Mosto de Cerveza y Agar- Maltin Power. El mosto ha sido donado por la empresa Pilsen. A 200 ml. de mosto se le agrego 2,7 gr. de agar en láminas compradas en el local comercial del barrio chino, lima y cortadas en segmentos de 2 a 3 cm. para la dilución del agar se llevó a microondas por 2 minutos, terminado este proceso fueron servido en 6 frascos de vidrio 30 ml/frasco y 20 ml. del medio restante fueron servidas en tubos de ensayo, todos fueron tapados con tapones de algodón con gasa especialmente preparados de 10x10 cm. y por ultimo fueron esterilizados en autoclave a 121°C por 15 minutos. Los pasos o el proceso de preparación del medio de cultivo Agar-Maltin Power fue igual al medio de cultivo agar-mosto de cerveza.

El subcultivo de la cepa madre de *Ganoderma lucidium* se llevó a cabo en condiciones de esterilidad dentro de la cámara de bioseguridad 1, con ayuda de bisturí se cortaron porciones o cuadraditos del medio de cultivo con *G. lucidium* y se llevaron a la superficie del medio fresco, se sellaron y se encubaron en una estufa a 27°C. Fig. 3 y 4



Fig. 3. Siembra en Cámara de cultivo y Fig. 4. Frascos de vidrio con agar mosto cerveza

#### Elaboración del sustrato de trigo y producción del inóculo (semilla)

El trigo resbalado, adquirido en el mercado de surco de la Av. Benavides fueron divididos en porciones de 250 – 300 gr. aproximadamente y embazados en frascos de vidrio, en cada frasco se le agregó 1.05 gr. de carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) + 3.9 gr. de yeso ( $\text{CaSO}_4$ ) y se agregó agua destilada hasta  $\frac{3}{4}$  partes del volumen del trigo, se tapó con tapones de algodón y se esterilizó en autoclave a 121°C por una (1) hora, terminado el proceso los frascos se colocaron en un ambiente controlado por 48 horas, transcurrido este tiempo se determinó la esterilidad del sustrato. Los sustratos y/o frascos fueron inoculados con micelios de *Ganoderma lucidium* cortados con bisturí en cuadrados de 0,5 x 0,5 cm. aproximadamente fig. 5 y 6, luego fueron incubados en condiciones ambientales por 7 días. La colonización del sustrato por el micelio se evidenció cuando el sustrato se cubrió de color blanco, y para acelerar la colonización se agitó el frasco de 3 a 4 veces, la semilla obtenida *Ganoderma lucidium* serán sembradas más adelante en los residuos de la industria maderera, Vargas, Y. Pérez, L. (2018).



Fig. 5. Micelio de *G. Lucidium* para inocular el sustrato



Fig. 6 sustrato de trigo para obtener semilla de *G. lucidium*

## Preparación del sustrato basado en aserrín e Inoculación con semilla de *G. lucidum*

En ensayo se llevo en condiciones del laboratorio, donde se utilizaron como control un sustrato basado en 80 % de aserrín de eucalipto con 20 % de afrecho con una humedad relativa de 65 a 70 %. Para los tratamientos del ensayo se tomaron las proporciones que se presentan en la tabla N° 1.

**Tabla 1. Distribución experimental de concentraciones de los sustratos**

	<b>Aserrín del eucalipto</b>	<b>Aserrín cedro</b>	<b>Aserrín pino</b>	<b>Afrecho</b>
<b>A</b>	<b>80 %</b>	-	-	<b>20 %</b>
<b>B</b>	<b>90 %</b>	-	-	<b>10 %</b>
<b>C</b>	-	<b>80 %</b>	-	<b>20 %</b>
<b>D</b>	-	<b>90 %</b>	-	<b>10 %</b>
<b>E</b>	-	-	<b>80 %</b>	<b>20 %</b>
<b>F</b>	-	-	<b>90 %</b>	<b>10 %</b>

El aserrín fue tamizado (este procedimiento se hace solo si las partículas son >2cm), a continuación se dejó orear para eliminar la humedad de la madera. Luego se añadió agua destilada de a pocos hasta alcanzar una humedad relativa entre 65 - 70%. En el caso del afrecho, se remojo con agua destilada y se dejó orear hasta que alcanzó una humedad relativa entre 40 - 45%

A continuación, se mezclaron las proporciones establecidas en la *tabla 1*, colocando un total de 200 g de mezcla por bolsa de polipropileno tal como se muestra en la Fig. 7 al que se le adaptó un cuello de tubo de plástico para facilitar el cierre con tapón de algodón, tal como se puede observar en la Fig.8. Las bolsas con el sustrato fueron sometidos a la esterilización en autoclave por 2 horas y se dejó enfriar por 48 horas, terminado este periodo de enfriamiento se inoculó con la semilla preparada con ayuda de una cuchara estéril, cubriendo las semillas inoculadas con el sustrato. Terminado el proceso de la inoculación las bolsas fueron colocadas o incubados a temperatura ambiente en un cuarto de cultivo, donde se puede mantener la humedad y la disposición del CO2 que requiere *G. lucidum* para su desarrollo.



Fig. 7. Bolsas polipropileno con sustrato antes de esterilizar



Fig. 8. Bolsas polipropileno + sustrato inoculado con semilla de *G. lucidum*

## Resultados

### Desarrollo del subcultivo de *G. lucidum* en 2 medios de cultivo.

La cepa pura y/o cultivo puro de *G. lucidum* sub-cultivadas en medios de cultivo agar mosto de cerveza (fig. 9) y agar maltin power (Fig. 10), lograron desarrollarse hábilmente en un 100 % en ambos medios de cultivo, lo que indica que las concentraciones tomadas de los componente del medio de cultivo fueron adecuados.

Además, no presento contaminación alguna en los sub cultivos realizados. A los 48 horas de sembrado se observó normal desarrollo y a los 7 días de cultivo colonizaron todos los frascos de cultivo.



Fig. 9. *G. lucidum* recién inoculado en medio de cultivo agar mosto cerveza  
26/04/19



Fig. 10. *G. lucidum* recién inoculado en medio de cultivo agar maltin power  
26/06/19

### Desarrollo del inóculo (semilla) de *G. lucidum* en sustrato de trigo

Al cabo de 4 días después de haber inoculado el sustrato de trigo con micelio de *G. lucidum*, se observó la colonización uniforme del sustrato por el micelio (Fig. 11), a los 11 días logro colonizar en un 70 % del sustrato (Fig. 12) y a los 21 días estaba completamente colonizado y listo para ser transferido o inoculado el sustrato de fructificación y/o producción propiamente dicho.



Fig. 11. Sustrato inoculado con *G. Lucidum* a 4 días de siembra



Fig. 12. sustrato inoculado con *G. lucidum* a 11 días de siembra.

### Proceso de fructificación de *G. lucidum* en sustratos planteados en el cuadro 1

Los tres tipos de sustratos fueron inoculados con micelio producido en granos de trigo resbalado (semilla) a razón de 150 g/bolsa distribuyéndola uniformemente con ayuda de una espátula estéril. Las bolsas con sustrato fueron inoculados bajo la corriente de aire de la cámara de flujo laminar y/o cámara de bioseguridad 1, inmediatamente después las bolsas fueron cerradas con tapones de algodón, que a su vez sirvió para el intercambio de gases con el ambiente externo. La colonización de los sustratos de aserrín de eucalipto y de pino fue bastante rápida y se completó en 13 - 18 días a 18 – 20°C, sin embargo, en el sustrato compuesto por aserrín de cedro enriquecido con afrecho la colonización fue parcial (fig. 13). Terminado el proceso de colonización las bolsas fueron establecidas en una cámara de cultivo adaptado para conservar la temperatura a 24°C por 8 a 10 días (Fig. 14). Después de este tiempo las bolsas fueron retiradas de la cámara y establecidas en una estantería metálica, donde, en algunas bolsas fueron destapadas (Fig. 15) y otras fueron perforadas mediante cortes en cruz con ayuda de un bisturí (Figs. 16 y 17) sitios de formación de los cuerpos fructíferos (carpóforos) emergentes de color blancuzco a amarillo dorado y de forma triangular. Se observó un crecimiento lento y conforme pasa el tiempo la punta de los cuerpos fructíferos se amarillan y con el tiempo se van haciendo progresivamente más pardos hacia la base.



Fig. 13. Colonización Micelial de los substratos a 13 días de inoculación



Fig. 14. Cámara adaptada para para regular la T° del cultivo



Fig. 15. Bolsa abierta para facilitar la fructificación de *G. lucidum*

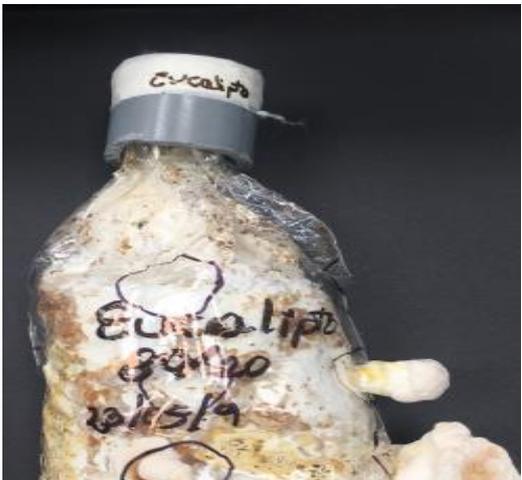


Fig. 16. Fructificación de *G. lucidum* en residuo de eucalipto a los 32 días

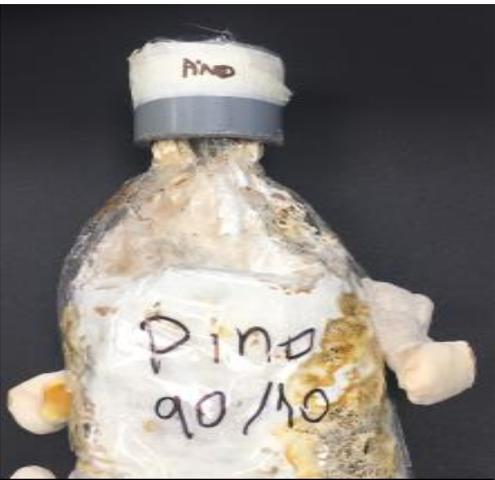


Fig. 17. Fructificación de *G. lucidum* en residuo de pino a los 32 días

## Discusión

Los recursos naturales han constituido siempre las principales fuentes para el desarrollo de la economía de un país. Además en los últimos años se ha logrado importante desarrollo en la tecnología, que ha traído como consecuencia una explotación cada vez mayor de dichos recursos y residuos forestales como es el aserrín que tiene efectos ambientales negativos; por lo que es necesario biotransformar para minimizar los efectos negativos sobre el medio ambiente.

Por otra parte *Ganoderma lucidum* es un Basidiomycete de la familia *Ganodermateaceae*, ampliamente reconocido por sus múltiples propiedades medicinales y nutraceuticas por muchos siglos en China, Japón y Corea (Wasser, 2005) donde se lo conoce como el hongo de la longevidad o inmortalidad. Este hongo posee numerosos metabolitos secundarios entre los que podemos mencionar, adenosina, proteínas, vitaminas, fenoles, oligoelementos, en particular los polisacáridos y triterpenoides Bidegain y et, al (2013) con propiedades antioxidantes, inmunoestimulantes, antitumoral, hepatoprotectora, hipoglucemiante, hipocolesterolemiante, entre otras Batra et, al, (2013); Russell and Paterson (2006); Sanodiya et al., (2009); Sliva, (2003). En China, *G. lucidum* es utilizado ancestralmente en la Medicina Tradicional y está incluido en la Farmacopea de la República Popular China. En Japón, el hongo Reishi está reconocido como un “alimento con usos específicos en salud” Tanaka et al, (2004).

Los estudios de biotransformación, basados en investigaciones previas, han permitido definir la composición adecuada de sustrato basados en residuos (aserrín) de la industria de aserradoras, calidad y producción del inóculo, la intensidad y duración del tiempo de fructificación y las condiciones de cultivo. Una de las principales aportes de esta investigación, es que se ha logrado el desarrollo de *G. lucidum* en sustratos en residuos de eucalipto, pino (principalmente) y cedro. Residuos agroindustriales de escaso valor en el Perú, cuya disposición habitual constituye un problema medioambiental Rivera, A. (2007).

El desarrollo de *G. lucidum*, como mencionan muchos autores no sólo depende de la cepa de hongo empleada, sino de la composición del sustrato y de las condiciones de manejo del cultivo, tal como muestran los resultados obtenidos en las figuras 1- 17.

El aserrín de eucalipto, cedro y pino – residuos forestales más abundantes en zonas alto andinas pueden ser convertidos en proteínas de alto valor económico y así minimizar el impacto negativo sobre el medio ambiente Escalona R, Beaton P, (2010).

El pretratamiento y/o tamizado desarrollado del residuo y/o aserrín - conjunto de partículas o polvillo que se desprende de la madera al momento de aserrada, para separar de otras partículas como la viruta (fragmento de material residual de forma de lámina curvada o espiral), corroboran a los trabajos desarrollados por Reyes J, (2013).

Estudios realizados por Evelton B, (1975) muestran, que, en los residuos (aserrín) de la industria aserradora, el contenido de la humedad depende en gran medida de la fase del proceso en que se extrae y del secado del producto antes de esta fase. Para

asegurar que el sustrato tenga humedad uniforme en el presente ensayo los residuos fueron sometidos al oreo por 24 horas en una estufa a 60°C.

Los residuos de eucalipto, pino y cedro utilizados en el ensayo en calidad de sustrato arrojan similares resultados en cuanto al contenido de humedad y tamaño de partículas, a los estudios realizados con aserrín de algarrobo y pino por Escalona R, Beatón P, (2010) y CEA, H, (2003), Morales, R. (2015), Idaly, R. (2015)

Los resultados obtenidos muestran, no todos los sustrato o residuos (aserrín) de la industria aserradora tienen la misma eficiencia biológica para el desarrollo de *G. lucidum*, por ejemplo en este ensayo el aserrín de cedro, no resultó eficiente ni para la proliferación del micelio ni para la fructificación, lo que corrobora a los estudios realizados sobre la presencia de compuestos polifenólicos y los taninos sustancias tóxicas para el desarrollo de algunos microorganismos, formación morfológica y coloración de hongos, como la temperatura, humedad y oxígeno Rodríguez, N.; Jaramillo C. (2005). Estas condiciones son estrictas para la fructificación *G. lucidum*, las bajas temperaturas ocasionen retraso tanto la etapa de formación de hifas como la etapa de fructificación Emine I. Erkel (2009).

## Conclusiones

Se logró establecer dos tipos de medio de cultivo consistentes en agar + mosto de cerveza y agar + bebida maltín power, que permite multiplicar mediante subcultivo en medio fresco y conservar a 4°C de la cepa pura de *G. lucidum*.

Se logró establecer el protocolo que permite la conversión del micelio de *G. lucidum* en semilla basado y enriquecido de trigo resbalado, que a su vez permitirá la producción de semilla de *G. lucidum* a nivel laboratorio para convertir residuos agroindustriales en productos de alto valor económico.

Se ha desarrollado el protocolo para la biotransformación mediada por *G. lucidum* los residuos forestales o provenientes de la industria aserradora como aserrín de escaso valor en el Perú, para minimizar y/o mitigar los efectos negativos sobre el ambiente por su disposición o gestión inadecuada, además se determinó no todos los residuos son eficientes para el desarrollo y fructificación de *G. lucidum*, sin embargo permite poner en práctica los objetivos del desarrollo sostenible de la ONU.

## BIBLIOGRAFÍA UTILIZADA Y/O CONSULTADA

Batra P.; Sharma AK; Khajuria R. (2013). "Probing Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom *Ganoderma lucidum* (Higher Basidiomycetes): A Bitter Mushroom with Amazing Health Benefits". *Int J Med Mushrooms* 15, pp.127–143.

Bidegain M; Cubitto MA; Curvetto NR. (2013). "Obtención de triterpenoides de *Ganoderma lucidum* cultivado en un sustrato a base de cáscara de girasol". En *VIII Encuentro Latinoamericano y del Caribe Biotecnología*. Mar del Plata.

CEA, H., "Caracterización de astillas y aserrín para una planta de tableros de partículas en Valdivia". Chile 2003.

Emine I. Erkel (2009). The effect of different substrate mediums on yield of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. Arslanbey Agricultural Vocational School, Kocaeli University, Kocaeli, Turkiye.

Escalona R., Beatón P. "Pirólisis autotérmica en lecho fluidizado de aserrín de algarrobo". Tecnología Química, 2010. Vol 30, N° 2, p. 95-101.

Idaly, R. (2015). Madera de vid como sustrato potencial para el cultivo sólido de *Ganoderma spp.* Tesis de postgrado. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Maxico.

Levelton B., "Combustion technology for the disposal and utilization of wood residue". Report EPS. 1975.

Lisiecka Jolanta, *et al.* (2015). Mycelium Growth and Biological Efficiency of *Ganoderma lucidum* on Substrate Supplemented with Different Organic Additives. Laboratory of Forest Resources Management, Division of Forest Environmental Sciences, Department of Agro–environmental Sciences, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Sasaguri, Fukuoka 811–2415, Japan.

Majid Azizi, Maryam Tavana, Mohammad Farsi, & Fatemeh Oroojalian (2012). Yield Performance of Lingzhi or Reishi Medicinal Mushroom, *Ganoderma lucidum* (W.Curt.:Fr.) P. Karst. (Higher Basidiomycetes), Using Different Waste Materials as Substrates. Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Melo, C. (2014). Viabilidade do uso de resíduos agrícolas no cultivo do cogumelo medicinal *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. Tesis de postgrado. Universidade Federal do Amazonas. Brasil.

Morales, R. (2015). Madera de vid como sustrato potencial para el cultivo sólido de *Ganoderma spp.* Tesis de postgrado.

Postemsky, P. *et al.* (2015). Aprovechamiento de residuos agroindustriales del arroz para el cultivo del hongo medicinal *Ganoderma lucidum*. CERZOS-CONICET-UNS (Centro de Recursos Naturales Renovables de la Zona Semiárida – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas – Universidad Nacional del Sur), Bahía Blanca, Argentina.

Reyes J., "Reacción asistida por microondas para la obtención de hidrocarburos a partir de aserrín de madera". Quito. 2013.

Rodríguez, N.; Jaramillo, C. (2005). Cultivo de hongos medicinales en residuos agrícolas de la zona cafetera. Federación Nacional de Cafeteros de Colombia.

Rivera, A. (2007). La subutilización de residuos agrícolas y su incidencia en la producción de hongo medicinal REISHI (*Ganoderma lucidum*). Tesis para obtener el grado de licenciado en Ingeniería de Alimentos. Universidad Técnica de Ambato – Ecuador

Russell M.; Paterson R. (2006). "Ganoderma - a therapeutic fungal biofactory". *Phytochemistry* 67, pp.1985–2001.

Sanodiya BS.; Thakur GS.; Baghel RK.; Prasad GBKS; Bisen PS. (2009). "Ganoderma lucidum: a potent pharmacological macrofungus". *Curr Pharm Biotechnol* 10, pp. 717–42

Sliva D. (2003). "Ganoderma lucidum (Reishi) in cancer treatment". *Integr Cancer Ther* 2, pp.358–64.

Vargas, Y. Pérez, L. (2018) Aprovechamiento de residuos agroindustriales en el mejoramiento de la calidad del ambiente. *Rev. Fac. Cienc. Básicas* Vol. 14 (1) 2018, 1-14 | Universidad Militar Nueva Granada

Wasser, S. (2005). "Reishi or Ling Zhi (*Ganoderma lucidum*)". *Encycl Diet Suppl*,pp. 603–622.

.

.

.