



UNIVERSIDAD  
**SAN SEBASTIAN**

FACULTAD DE INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA  
INGENIERÍA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

Producción del Hongo Ectomicorrícico *Suillus luteus* (Linnaeus  
ex Fries) Gray en Reactor Agitado

PROYECTO DE TÍTULO PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

AUTOR: Ruy Manuel Travieso Kramer

PROFESOR GUÍA: Cristian Canales

CONCEPCIÓN, Noviembre de 2009

## Resumen

El estudio realizado tiene por objetivo desarrollar una tecnología para la producción y medición de biomasa fúngica para la fermentación de una especie de hongo ectomicorrícico, *Suillus luteus*, tanto en frascos agitados como en un reactor agitado. Se determinó la temperatura de trabajo para las fermentaciones del hongo en medio líquido como primera actividad. Se realizaron cinéticas en frascos, en las que se empleó el medio Melin-Norkrans (MMN), en estas se probaron tres temperaturas de trabajo (10°C, 23°C y 30°C). Encontrándose que la temperatura que presenta un mayor crecimiento es la de 23°C, produciendo 2,7 g/L de biomasa en 12 días, a partir de un inóculo inicial de 1,11 g/L de micelio-agar picado.

Se evaluaron los parámetros de crecimiento del hongo en una cinética de crecimiento realizada en frascos agitados y cultivada con medio MMN y en una cinética de crecimiento realizada en un reactor agitado, cultivado con medio Biotina Acido Fólico (BAF). Se realizaron mediciones de biomasa y sustrato en el transcurso de la cinética y se calcularon los valores de velocidad específica de crecimiento, rendimiento de sustrato en biomasa, tiempo de duplicación, productividad total de biomasa y productividad máxima de biomasa, encontrándose valores de 0,074 día<sup>-1</sup>; 0,23; 9,321 día; 0,083 g/L día y 0,132 g/L día, respectivamente para la cinética realizada en frascos y se encontraron valores de de 0,0448 día<sup>-1</sup>; 0,038; 15,47 día; 0,0098 g/L día y 0,019 g/L día, respectivamente para la cinética realizada en el reactor agitado.

Se concluye que el hongo manifestó la capacidad de crecer en condiciones controladas, tanto en frascos agitados como en un reactor agitado. Por otra parte, las técnicas empleadas para la medición de las cinéticas (peso seco como índice de crecimiento de biomasa, medición de glucosa como índice de consumo de sustrato, etc.) son aplicables para las fermentaciones y caracterizaciones cinéticas de hongos ectomicorrícicos.

Dedico este trabajo a todos aquellos que confiaron en mí, pese a las vicisitudes de la vida, a las duras circunstancias que siempre me han rodeado y al sinfín de enfermedades que he sabido superar... Gracias familia.

Se lo dedico a Katherine, quien me ha acompañado en esta última parte de mi vida y que me ha llenado de fuerza, alegría y amor... Te amo más que a todo.

Se lo dedico a mis compañeros de equipo y amigos rivales, por que sin ellos no hubiese tenido la fuerza de terminar este recorrido, no hubiese tenido una voz que me desviara del camino y me llevara a todos aquellos lugares, sin los que no habría llegado hasta donde estoy.

Por sobre todo se lo dedico al baloncesto que nunca me abandonó por más veces que lo dejé de lado y que me brindó las mejores amistades y experiencias de mi vida.

## Agradecimientos

Agradezco a todos aquellos que hicieron posible este trabajo, directa o indirectamente, su apoyo ha sido fundamental.

Agradezco al Instituto Forestal de Chile (INFOR) por permitirme desarrollar esta tesis como parte del proyecto financiado por INNOVA Chile: “Selección de Inóculos Biológicos y Desarrollo de Tecnologías para su Aplicación en Viveros Forestales”. Agradezco a todo su personal, en especial a don Patricio Chung y doña Marta Gonzáles, quienes confiaron plenamente en mis capacidades y me permitieron desarrollar este trabajo de forma óptima.

Agradezco a la Universidad San Sebastián por la calidad educacional que me entrego en mi periodo de formación, a los funcionarios de esta institución y su dedicada labor, sin ellos los logros en mi vida universitaria no hubiesen sido posibles.

Agradezco a mis profesores y formadores en el largo camino que me ha desarrollado, tanto académica como personalmente, desde niño. En especial al profesor Edison Carrión quien me mostró el mundo de la ciencia, apasionante y divertido... Gracias.

*“Daría todo lo que sé, por la mitad de lo que ignoro”*

*“Para investigar la verdad es preciso dudar,  
en cuanto sea posible, de todas las cosas”*

René Descartes

## Índice

### CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes generales.....	1
1.1 Objetivo general.....	4
1.2 Objetivos específicos.....	4

### CAPITULO 2

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Los hongos.....	5
2.2 Reproducción fúngica.....	7
2.3 Micelio.....	10
2.4 Micorrizas.....	11
2.5 Tipos de micorrizas.....	13
2.5.1 Micorrizas orquidioides.....	14
2.5.2 Micorrizas ericales.....	15
2.5.3 Hongos ectendomicorrícicos.....	15
2.5.4 Hongos endomicorrícicos.....	15
2.5.5 Hongos ectomicorrícicos.....	16
2.6 Diversidad de hongos.....	18
2.7 <i>Suillus luteus</i> .....	19
2.8 Cultivo de <i>Suillus luteus</i> .....	21
2.9 Medio de cultivo.....	24
2.10 Condiciones de cultivo.....	26

### CAPITULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
---------------------------	----

3.1 Selección del inóculo ectomicorrícico de <i>Suillus luteus</i> .....	28
3.2 Medio de cultivo.....	28
3.3 Esterilización.....	29
3.4 Protocolos de cultivo.....	30
3.4.1 Stock inicial.....	30
3.4.2 Cultivo en placas.....	31
3.4.3 Metodología de corte de trozos de micelio-agar.....	31
3.4.4 Inoculación en frascos.....	31
3.4.5 Inoculación en reactor.....	31
3.5 Reactor.....	32
3.6 Condiciones de cultivo y operación .....	32
3.6.1 Cultivo en placas.....	33
3.6.2 Cultivo en frascos.....	33
3.6.3 Cultivo en reactor.....	33
3.7 Obtención de muestras.....	34
3.7.1 Cultivo en frascos.....	34
3.7.2 Cultivo en reactor.....	34
3.8 Determinación de sustrato.....	34
3.9 Determinación de proteína.....	35
3.10 Determinación de variación de pH.....	37
3.11 Determinación de biomasa.....	37
3.12 Determinación de parámetros.....	38
3.12.1 Velocidad específica de crecimiento.....	38
3.12.2 Rendimiento de sustrato en biomasa.....	39
3.12.3 Tiempo de duplicación de biomasa.....	39
3.12.4 Productividad de biomasa.....	40
CAPITULO 4	
RESULTADOS.....	41
4.1 Determinación de temperatura de cultivo en frascos.....	41

4.2 Determinación de los parámetros de crecimiento en frascos.....	45
4.3 Determinación de los parámetros de crecimiento en reactor agitado.	48
CAPITULO 5	
DISCUSIÓN.....	53
5.1 Determinación de temperatura de cultivo en frascos.....	53
5.2 Determinación de los parámetros de crecimiento en frascos.....	54
5.3 Determinación de los parámetros de crecimiento en reactor agitado.	58
CAPITULO 6	
CONCLUSIONES.....	64
CAPITULO 7	
RECOMENDACIONES.....	65
BIBLIOGRAFÍA.....	66
ANEXO 1.....	72
ANEXO 2.....	73
ANEXO 3.....	74
ANEXO 4.....	76

## Índice de figuras

Figura 2.1	Las 5 divisiones del Reino <i>Fungi</i> .....	5
Figura 2.2	Esquema de digestión externa de los hongos lisotróficos.....	6
Figura 2.3	Estructuras reproductivas de Ascomicetes y Basidiomicetes..	9
Figura 2.4	Hifas septadas y sifonadas.....	11
Figura 2.5	Micorriza en plántula de pino de 4 cm de crecimiento.....	13
Figura 2.6	Tipos de micorrizas.....	14
Figura 2.7	Principales tipos de micorrizas.....	16
Figura 2.8	Estructura de la interacción de los hongos ectomicorrícicos...	17
Figura 2.9	Hongos <i>Suillus luteus</i> .....	20
Figura 2.10	Pellets de <i>Suillus luteus</i> , a partir de cultivo sumergido.....	22
Figura 3.1	Reactor LiFlus GM de BIOTRON.....	32
Figura 4.1	Cinética de crecimiento de <i>Suillus luteus</i> a 10°C.....	41
Figura 4.2	Cinética de crecimiento de <i>Suillus luteus</i> a 23°C.....	42
Figura 4.3	Cinética de crecimiento de <i>Suillus luteus</i> a 30°C.....	43
Figura 4.4	Cinética de crecimiento de <i>Suillus luteus</i> en frascos.....	44
Figura 4.5	Velocidad específica de crecimiento de <i>Suillus luteus</i> en frascos.....	45
Figura 4.6	Rendimiento de sustrato en biomasa de <i>Suillus luteus</i> en frascos.....	46
Figura 4.7	Cinética de crecimiento de <i>Suillus luteus</i> en reactor agitado...	48
Figura 4.8	Velocidad específica de crecimiento de <i>Suillus luteus</i> en reactor agitado.....	49
Figura 4.9	Rendimiento de sustrato en biomasa de <i>Suillus luteus</i> en reactor agitado.....	50
Figura A.1	Curva de calibrado de glucosa.....	71
Figura A.2	Curva de calibrado de proteína.....	75

## Índice de tablas

Tabla 2.1	Clasificación científica <i>Suillus luteus</i> .....	20
Tabla 2.2	Formulación de medios de cultivo específicos para hongos...	25
Tabla 2.3	Condiciones de cultivo previamente utilizadas.....	26
Tabla 3.1	Formulación de medios de cultivo.....	32
Tabla 4.1	Resumen de parámetros cinéticos	44
Tabla 4.2	Parámetros de crecimiento de <i>Suillus luteus</i> en frascos.....	47
Tabla 4.3	Parámetros de crecimiento de <i>Suillus luteus</i> en reactor agitado.....	50
Tabla 5.1	Composición elemental de biomasa en hongos.....	54
Tabla 5.2	Requerimientos nutricionales según la composición de biomasa de un hongo.....	55

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes generales

El desarrollo de tecnologías avanzadas para la fermentación de organismos vivos y la producción de biomasa o metabolitos de interés, es un área de estudio en la cual se han desarrollado investigaciones desde el siglo XIX con los descubrimientos de Louis Pasteur.

El desarrollo del cultivo de organismos vivos ha progresado en este periodo de tiempo. Gracias a las nuevas tecnologías que se han creado y se han puesto al servicio de estos propósitos, se ha logrado optimizar los tiempos de cultivo, utilizar los nutrientes con rendimientos más altos, mejorar la productividad, etc.

La fermentación de organismos vivos en condiciones ideales, controladas con instrumentos de alta precisión, en ambientes estériles, durante periodos de tiempo fijos y en cultivos con alimentaciones controladas, son condiciones que se alcanzan con alta eficiencia en los cultivos en reactores agitados. La aplicabilidad de estos últimos en la productividad de los cultivos de organismos vivos es de gran beneficio en la producción de muchos tipos de ellos, tales como bacterias de interés, células vegetales, hongos, etc. (Acevedo, 2002).

Los reactores agitados o biorreactores, cuando su propósito es el cultivo de organismos vivos, además de proporcionar una alternativa de cultivo con vastos perfeccionamientos, entregan la posibilidad de escalar los procesos en desarrollo hasta niveles industriales, conservando los rendimientos y mejoras logradas en escalas inferiores (Stanbury, 2003).

Dentro de las especies que pueden ser cultivadas en biorreactores para optimizar sus parámetros de crecimientos se encuentran los hongos, organismos en

su mayoría multicelulares, de células eucariontes. Los hongos son capaces de formar un cuerpo fúngico multicelular de apariencia filamentosa, donde un filamento fúngico se denomina hifa y todas las hifas de un solo organismo se llaman colectivamente micelio (Izco, 2004).

Los hongos que son capaces de formar asociaciones simbióticas mutualistas con las plantas, a través de sus raíces y de forma intercelular, son conocidos como hongos ectomicorrícicos. Estos hongos poseen gran importancia, pues al asociarse con plantas de interés económico, como las especies forestales, favorecen el crecimiento veloz y sano de las plantas (Raven, 1999; Izco, 2004)

Entre las tecnologías que contribuyen al aumento de la productividad de las plantaciones forestales, se encuentra la inoculación de plantas con hongos ectomicorrícicos seleccionados, que pueden promover un mejor establecimiento y crecimiento, especialmente en suelos pobres y degradados (Rossi, 2006).

El hongo ectomicorrícico *Suillus luteus*, es un Basidiomicete, es decir, se reproduce a través de basidios y corresponde a una especie abundante en los bosques de pinos, especie forestal de gran importancia económica para Chile (Rossi, 2006; Empresas CMPC, 2009).

La utilización de hongos ectomicorrícicos en las plantaciones forestales de interés económico, es una técnica poco utilizada que podría proveer de árboles de pino más fuertes y sanos a la industria forestal del país en menor tiempo.

En nuestro país, el Instituto Forestal (INFOR), consta con una vasta experiencia en el cultivo de especies forestales, a nivel de laboratorio y a nivel de viveros. INFOR ha desarrollado investigaciones en el campo de la micología y dentro de esta línea de trabajo ha producido y aplicado hongos ectomicorrícicos en forma experimental, en viveros forestales (CTPF, 2009).

Debido a lo anterior, el presente estudio consiste en analizar los distintos parámetros de crecimiento de un hongo ectomicorrícico, *Suillus luteus*, para implementar una tecnología de producción y medición de micelio en medio líquido y cultivado en un reactor agitado.

## 1.2 Objetivo general

Desarrollar una tecnología para la producción de micelio ectomicorrícico, de *Suillus luteus*, en medio líquido y cultivado por lotes en un reactor agitado, para su uso en viveros forestales.

## 1.3 Objetivos específicos

- Determinar los parámetros de la cinética de crecimiento de *Suillus luteus*, cultivado en medio líquido en frascos con agitación.
- Determinar el efecto de la temperatura en la cinética de crecimiento de *Suillus luteus*, cultivado en medio líquido en frascos con agitación.
- Caracterizar el crecimiento de *Suillus luteus*, cultivado en medio líquido en un reactor agitado.

## CAPITULO 2

### REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 2.1 Los hongos

Los hongos son organismos vivos eucariotas pertenecientes al reino *Fungi* (Latín: “Hongos”). Morfológicamente, no poseen cloroplastos, por lo que se alimentan de sustancias orgánicas sintetizadas por otros organismos, es decir, son heterótrofos. Por otra parte, poseen paredes celulares compuestas por quitina, a diferencia de las paredes celulares de las plantas que están compuestas por celulosa. Además se reproducen con un eficiente método de propagación a través de esporas, aéreas o nadadoras, y en su generalidad, están compuestos de un cuerpo vegetativo filamentososo, dotado de una gran capacidad de transporte interno de sustancias (Izco, 2004).

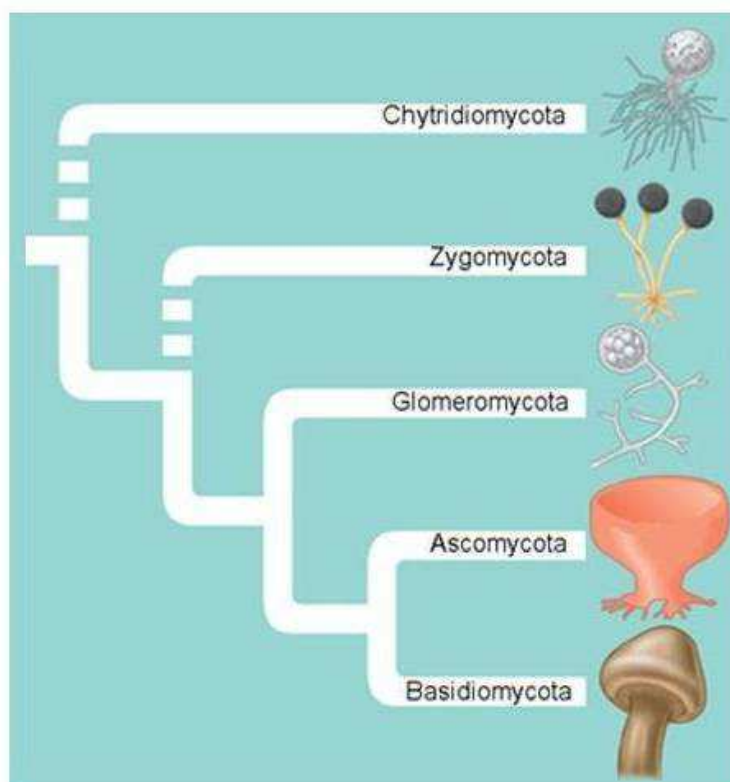


Figura N°2.1: Las 5 divisiones del Reino *Fungi* (Modificado de Pearsons Benjamin Cummings, 2005).

Los hongos contemplan un grupo heterogéneo, polifilético, con organismos pertenecientes al menos a tres líneas evolutivas diferentes. Actualmente se clasifica el reino *Fungi*, en 5 divisiones: Quitridiomycetes (división *Chytridiomycota*), Zigomicetes (división *Zygomycota*), Glomeromicetes (división *Glomeromycota*), Basidiomicetes (división *Basidiomycota*) y Ascomicetes (división *Ascomycota*) (figura N° 2.1) (Sitte, 2002; Izco, 2004).

Fisiológicamente, los hongos pueden dividirse en dos grandes grupos: aquellos que se alimentan por fagocitosis gracias a que poseen un aparato vegetativo desnudo, típicamente en forma de una gran ameba plasmodial, llamados Hongos Ameboides. Por otra parte, se encuentran los Hongos Lisotrófos que tienen una fase asimiladora provista de pared celular, por la que atraviesan sustancias solubles a través de difusión (osmotrofia). Frecuentemente, estas moléculas disueltas son el producto de un proceso de digestión externa de moléculas insolubles más grandes (lisotrofia), posibilitado por la adaptación de un aparato vegetativo filamentoso y ramificado (este conjunto de filamentos o hifas forma el micelio) (figura N° 2.2) (Raven, 1999; Sitte, 2002; Izco, 2004).

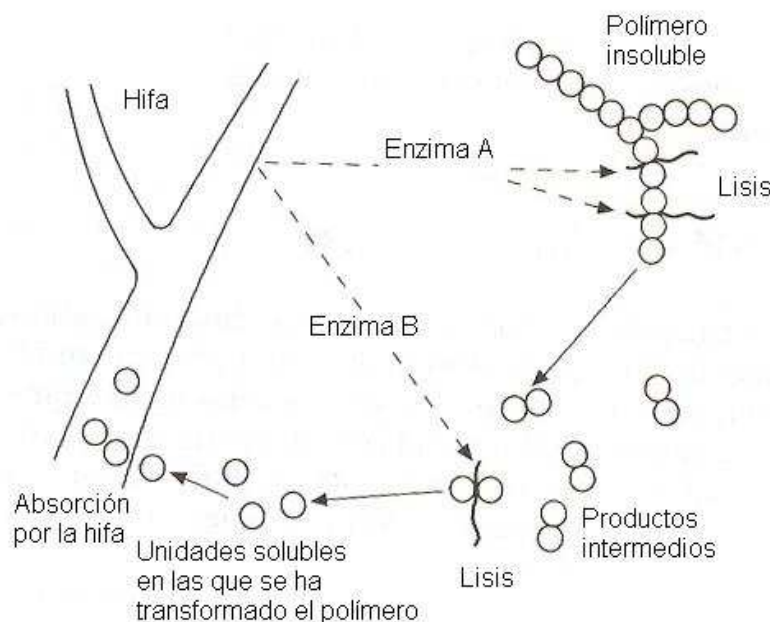


Figura N° 2.2: Esquema de digestión externa de los hongos lisotróficos (Izco, 2004).

La mayoría de los Hongos Lisótrofos y del conjunto de hongos en general (más del 98%) componen un grupo monofilético, incluidos en una gran división llamada *Eumycota* u Hongos Verdaderos. El origen de estos hongos no es claro, según Cavalier-Smith (citado por Izco, 2004), estos provienen de un grupo de protozoos, específicamente Coanoflagelados con teca (Salpingoécidas). Paralelamente, de ancestros similares habría derivado el vasto grupo de los animales (Reino *Animalia*), por lo que los Hongos Verdaderos estarían más próximos a los animales que a las plantas (Reino *Plantae*), por lo que también podrían haber aparecido antes que las plantas terrestres (Izco, 2004).

Los aspectos más característicos de los Hongos Verdaderos son: la presencia de un flagelo liso dirigido hacia atrás (sólo en el grupo con presencia de células flageladas); la composición química de la pared celular, con presencia de quitina por lo general y nunca de celulosa; y las mitocondrias con crestas planas (Izco, 2004).

## **2.2 Reproducción fúngica**

Los hongos se reproducen en un ciclo, que se inicia con el haplonte (con excepción en el haplodiplonte en las Blastocladales), en los Ascomicetos y Basidiomicetos domina una nueva fase: la dicariótica, donde las células poseen dos núcleos haploides cada una, siendo funcionalmente diploides. Sin embargo, el ciclo haplodicariótico es el más característico dentro de los hongos superiores, pues no existe en ningún otro grupo (Sitte, 1999).

La mayoría de los hongos son eucárpicos, es decir, sus estructuras reproductoras se forman sobre una parte determinada del talo, mientras que el resto del organismo continúa realizando funciones somáticas. Si bien es cierto, un trozo de micelio, bajo las condiciones necesarias, puede servir de propágulo; es decir, podrá servir para propagar vegetativamente el resto del cuerpo del hongo, la normalidad de la reproducción de los hongos se da por la formación de células reproductoras especializadas, las esporas (Sitte, 2002; Izco, 2004)

Las esporas pueden ser acuáticas y nadadoras, al contar con la presencia de flagelos, en cuyo caso se llaman zoosporas o planosporas. En la mayoría de los casos son aéreas, es decir, desprovistas de flagelo, por lo que su desplazamiento es pasivo, normalmente impulsadas por el aire y se llaman aplanosporas, y suelen tener una pared muy dura (Izco, 2004).

Las esporas pueden producirse asexualmente previa mitosis, por lo que son denominadas mitosporas, éstas se forman por la división interna de los núcleos de las células madre, en torno a los cuales se formarán otras tantas esporas, que al principio madurarán dentro de la pared de la célula madre, constituyendo un esporangio, donde se desarrollaran las esporangiosporas conocidas también como endosporas. También es frecuente la producción de exosporas asexuales, llamadas conidios, que se forman previos a la división de una célula conidiógena. Los conidios pueden ser formados por septación o fragmentación de una hifa preexistente (taloconidios), o por la formación de vesículas de pared nueva que se hinchan para recibir una copia del núcleo (blastoconidios) (Izco, 2004).

Por otra parte, el ciclo de un hongo puede alternar entre fases conidicas (anamórficas) y fases de reproducción sexual (telomórficas). Esta fase, también llamada fase perfecta, comprende la reunión de gametos o núcleos gaméticos, con lo que se hace posible la recombinación del material genético y la formación de esporas previa meiosis, por lo que se les conoce como meiosporas. La reproducción se puede dar por isogamia (fecundación entre gametos de tamaño y forma igual) o anisogamia (fecundación entre gametos de tamaño y forma desigual), e inclusive por oogamia (fecundación entre un gameto masculino móvil y pequeño y un gameto femenino grande e inmóvil), en el medio acuático. Sin embargo, por adaptación a la vida terrestre, la fecundación se simplificó y puede darse por el simple contacto de gametangios (células sexuales con núcleos gaméticos), con cesión directa de núcleos a través de un poro y un tubo, o bien la fusión completa de gametangios (copulación gametangial o gametangiogamia) (Sitte, 2002; Izco, 2004).

En los hongos superiores, una de las características más interesantes de la reproducción, yace en la separación en el tiempo entre las dos fases de la fecundación, la plasmogamia (fusión de los citoplasmas) y la cariogamia (fusión de los núcleos). Esto da lugar a células dicariones, donde el micelio dicariótico puede mantenerse mucho tiempo conteniendo dos núcleos haploides por célula, aunque desde el punto de vista genético contiene toda la información de un organismo diploide. Cuando finalmente se completa la reproducción sexual con la cariogamia, seguidamente ocurre la meiosis y origina endosporas en el interior de ascas (células en forma de saco que contienen en su interior esporas), llamadas ascosporas, o exosporas (estructura externa que contiene esporas), llamadas basidiosporas (figura N° 2.3) (Sitte, 2002; Izco, 2004).


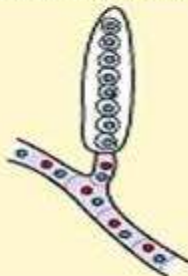


<i>Phylum</i>	<i>Característica Reproductiva</i>
<p><i>Ascomycota</i></p> 	<p><i>Esporas sexuales originadas internamente en sacos llamados ascas</i></p> 
<p><i>Basidiomycota</i></p> 	<p><i>Esporas sexuales originadas externamente en estructuras llamadas basidios</i></p> 

Figura N° 2.3: Estructuras reproductivas de Ascomicetes y Basidiomicetes (Modificado de Pearsons Benjamin Cummings, 2002).

Cabe destacar que es posible que ocurra un tipo de recombinación genética sin la mediación de la fusión de gametos ni la meiosis. Esto ocurre a través de un proceso llamado heterocariosis (fusión de micelios genéticamente distintos). Este fenómeno se conoce como parasexualidad y es el resultado de un conjunto de

alteraciones poco probables entre cromosomas de los núcleos y segmentos de los cromosomas, que se intercambian durante la mitosis (Izco, 2004).

### **2.3 Micelio**

Los Hongos Verdaderos, en su mayoría, tienen un aparato vegetativo en forma de micelio, formado por hifas cilíndricas, ramificadas y delimitadas por una pared tubular. Pueden encontrarse sin la presencia de septos, por lo tanto cenocíticas, llamadas hifas sifonadas. En los grupos más complejos se encuentran con septos, llamándose hifas septadas, que si bien fortalecen la estructura, no impiden el transporte de sustancias, gracias a la presencia de poros, se presenta la composición detallada de hifas septadas y sifonadas en la figura N° 2.4. Las hifas se encuentran muy bien adaptadas para la exploración del sustrato, para el ataque enzimático y la posterior adsorción de los nutrientes solubles así liberados, además de transportarlo rápida y eficazmente dentro del organismo (Izco, 2004).

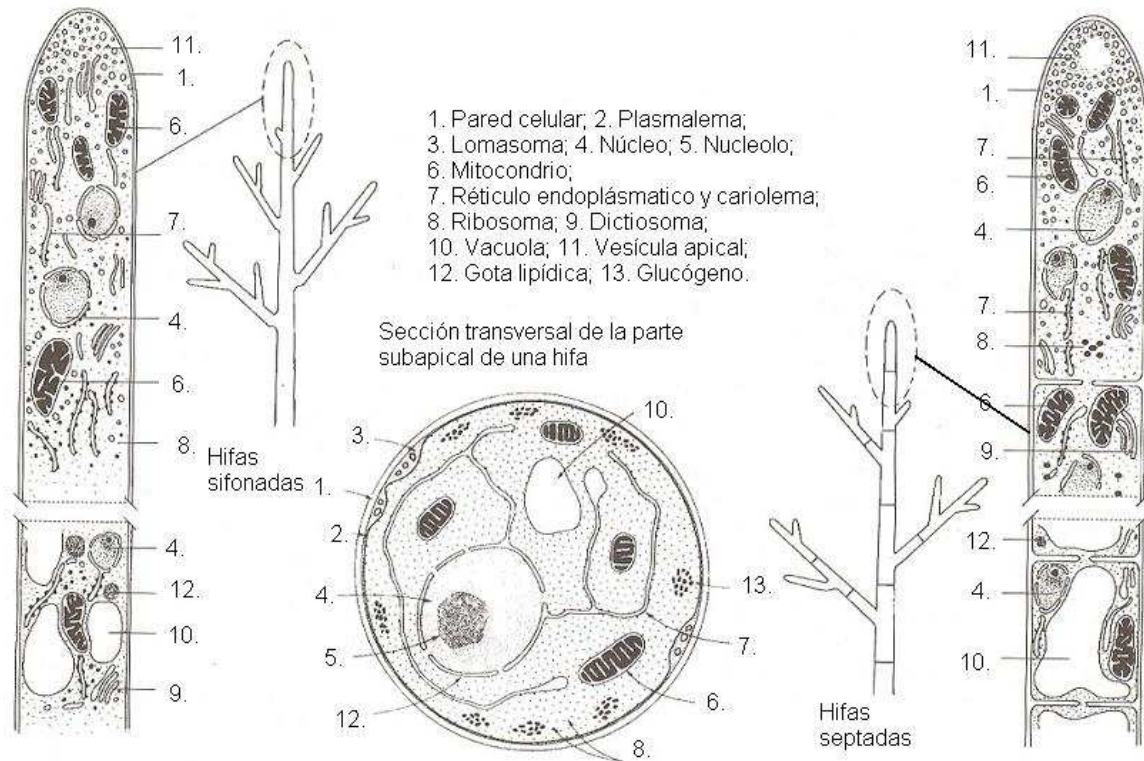


Figura N° 2.4: Hifas septadas y sifonadas (Izco, 2004).

El crecimiento de las hifas se encuentra localizado exclusivamente en la zona apical, los tramos más viejos de las hifas se van vacuolizando, con lo que el citoplasma y las sustancias nutritivas se ven empujadas hacia la punta de las hifas. En la punta de la hifa se encuentra un engrosamiento de la pared, donde se encuentra una matriz de microfibrillas de quitina, entre las cuales se deposita un relleno proteico y polisacárido no fibrilar. Por otra parte, la membrana celular posee una particularidad, la presencia de ergosterol, sustituyendo al colesterol de los plasmalemas animales (Sitte, 2002; Izco, 2004).

## 2.4 Micorrizas

Micorrizas es el término acuñado por Albert Bernhard Frank en 1885, del griego “*mycos*” (Hongo) y “*rhizos*” (Raíz). Describe las asociaciones que los hongos establecen en las raíces o rizoides de las plantas. La relación simbiótica que se

genera es mutualista, es decir, ambos salen beneficiados de esta asociación. Por una parte la planta obtiene nutrientes (minerales, agua, entre otros) y el hongo obtiene hidratos de carbono y vitaminas que de otra forma no podría obtener (Raven, 1999; Izco, 2004).

Hoy en día se sabe que la gran mayoría de las plantas terrestres forman micorrizas, se reconoce su presencia en briofitas, sobre todo Hepáticas, en muchas Pteridofitas, en todos los grupos de Gimnospermas y en la mayoría de las Angiospermas; aunque se conocen algunas familias que han desarrollado resistencia a los hongos micorrícicos, las Ciperáceas, las Juncáceas, las Cariofiláceas y las Crucíferas. Por su parte los taxones fúngicos que establecen micorrizas son Zigomicetos, Ascomicetos, Basidiomicetos y Deuteromicetos (Raven, 1999; Izco, 2004).

La presencia de micorrizas está presente, inclusive, en los fósiles de las plantas vasculares primitivas y eran tan frecuentes como los son hoy en día. Esto sugiere que la evolución de la asociación micorrícica pudo haber sido uno de los pasos decisivos en la colonización vegetal de la tierra firme. De hecho las micorrizas son uno de los tipos de simbiosis más abundantes en la biosfera, esto gracias a la demostrada habilidad superior de las raíces micorrizadas en la captación de agua y nutrientes; en consecuencia, las plantas micorrizadas tienen mayores posibilidades de colonizar los suelos más pobres (Raven, 1999; Izco, 2004).

El hongo, a través de sus hifas, establece la infección en los periodos de crecimiento activo de las raíces de las plantas, las que son atraídas por exudados de la raíz, penetrando las raíces secundarias de la planta, modificando su anatomía y formando la micorriza, como se puede ver en la plántula de pino de tan solo 4 cm de crecimiento sobre el suelo de la figura N° 2.5. El hongo en el proceso de infección solo invadirá la epidermis y el córtex de la raíz, sin entrar nunca, en el cilindro vascular y en el tejido meristemático (Raven, 1999; Izco, 2004).

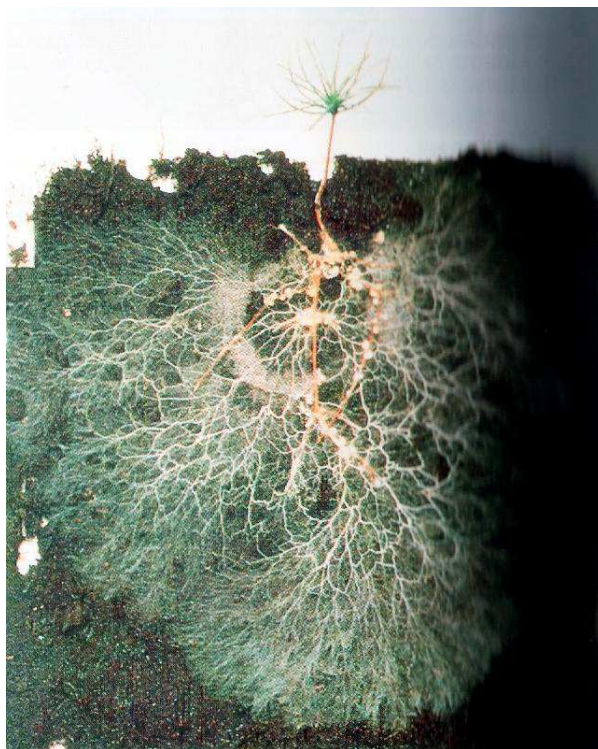


Figura N° 2.5: Micorriza en plántula de pino de 4 cm de crecimiento (Raven, 1999).

Existe un gran número de ventajas que proporciona la existencia de las micorrizas. Gracias a ésta, la planta es capaz de explorar un mayor volumen de suelo que la que alcanza sólo con sus raíces, puesto que se le suman las hifas del hongo, permitiendo captar con mayor facilidad el agua y los elementos (fósforo, nitrógeno, calcio y potasio). La protección que el hongo le brinda a la planta le permite resguardarse de los cambios de temperatura y la acidificación del suelo derivada de la presencia de azufre, magnesio y aluminio y brindándole un mayor tiempo de vida a las raíces que presentan la micorrización (Raven, 1999; Izco, 2004).

## 2.5 Tipos de micorrizas

La gran mayoría de las plantas terrestres presentan micorrizas. Según los caracteres morfológicos y anatómicos que se desarrollan y la posición relativa de las hifas fúngicas a las células de la raíz, se pueden reconocer hasta siete tipos distintos

de micorrizas: Ectomicorrizas, Endomicorrizas (Vesículo-Arbusculares o VA), ectendomicorrizas, micorrizas arbutoides, ericoides, monotropoides y de orquídeas. Aunque los dos tipos principales son las Endomicorrizas (Vesículo-Arbusculares o VA) y las Ectomicorrizas (fig. N° 2.6) (Izco, 2004).

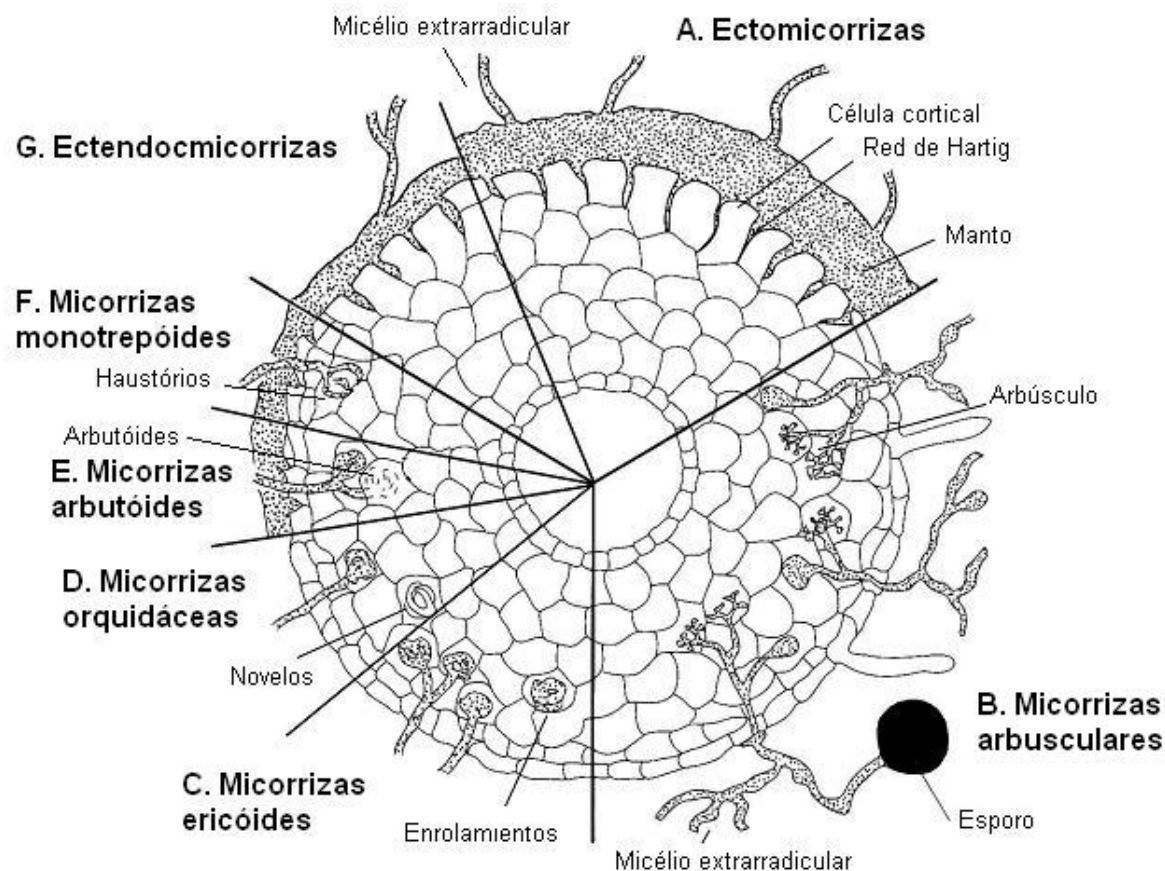


Figura N° 2.6: Tipos de micorrizas (Universidad de Coimbra, 2009).

### 2.5.1 Micorrizas orquídioides

Las micorrizas orquídioides producen la infección en un estadio muy temprano de la orquídea, las semillas tienen pocas reservas y cuando germinan ya cuentan con hongos micorrizógenos que les aportan carbohidratos y nutrientes. La hifa penetra en el suspensor y forma rizos muy ramificados de célula en célula y así se desarrolla la plántula hasta que es capaz de realizar fotosíntesis, aunque la infección continúa durante la vida adulta de la planta (fig. N° 2.6 D) (Izco, 2004).

### **2.5.2 Micorrizas ericales**

Las micorrizas Ericales realizan su simbiosis con las plantas de ese orden (plantas leñosas que crecen en suelos pobres o ácidos), estas micorrizas a su vez comprenden tres tipos: Ericoides (fig. N° 2.6 C), Arbutoides (fig. N° 2.6 E) y Monotropoides (fig. N° 2.6 F). En las Ericoides las células del hospedante son invadidas por hifas intracelulares y forman rizos típicos, con invaginación de su plasmalema y en la superficie de la raíz forma una trama de hifas. El hongo vive asociado a la planta alrededor de 3 a 4 semanas, hasta que la raíz es degenerada y luego muere. En las Arbutoides se repite el mismo proceso que en las Ericoides, aunque en este tipo se forma manto y red de Hartig. En las Monotropoides la asociación se forma con plantas sin clorofila del género *Monotropa*, la planta depende del hongo en esta asociación para vivir, ya que la provee de carbohidratos provenientes de otras plantas con las que también se encuentra conectado (Izco, 2004).

### **2.5.3 Hongos ectendomicorrícicos**

Las Ectendomicorrizas reúnen características de los dos tipos principales (Ectomicorrizas y Endomicorrizas), en general el manto está muy reducido, aunque la red de Hartig está muy bien desarrollada y la penetración intracelular se produce por medio de enrollamientos hifales o rizos (figura N° 2.7 C y figura N° 2.6 G) (Izco, 2004).

### **2.5.4 Hongos endomicorrícicos**

Las endomicorrizas, micorrizas endotróficas o Vesículo-Arbusculares son el tipo mas común y ampliamente distribuido, se desarrollan en las raíces primarias donde las hifas se conectan inter e intracelularmente con el hospedante para formar vesículas y arbusculos. Las hifas no son septadas, no forman manto y sólo algunas de ellas exploran el suelo, además no ocurre modificación del sistema de

ramificación de las raíces de las plantas (figura N° 2.7 B y figura N° 2.6 B) (Izco, 2004).

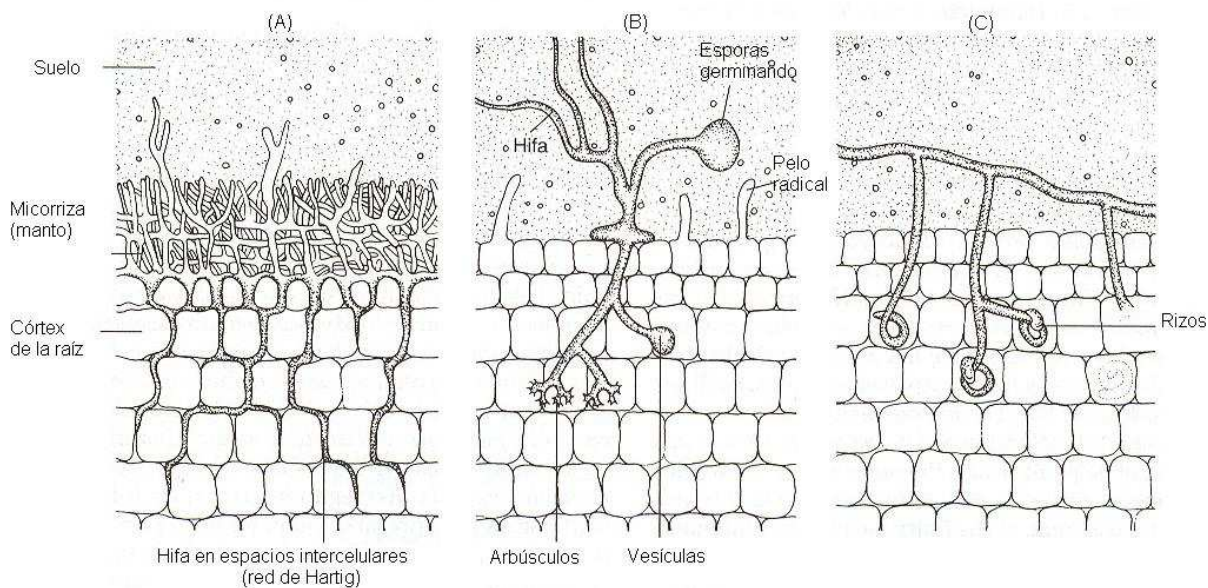


Figura N° 2.7: Principales tipos de micorrizas (Izco, 2004).

### 2.5.5 Hongos ectomicorrícicos

Las ectomicorrizas o micorrizas ectotróficas, se establecen cuando el micelio fúngico coloniza las raíces de la planta de forma intercelular formando una envoltura sobre las raíces afectadas denominado manto. Desde el manto, las hifas crecen individualmente, hacia fuera, introduciéndose al suelo, y hacia dentro, intercalándose entre las células del córtex de la raíz (a través de la lámina media), logrando de esta manera formar un entramado llamado red de Hartig (figura N° 2.8). En esta estructura, el micelio deja de estar tabicado, es cenocítico, lo que es interpretable como una ventaja para los procesos de intercambio (fig. N° 2.6 A y fig. N° 2.7 A) (Izco, 2004).

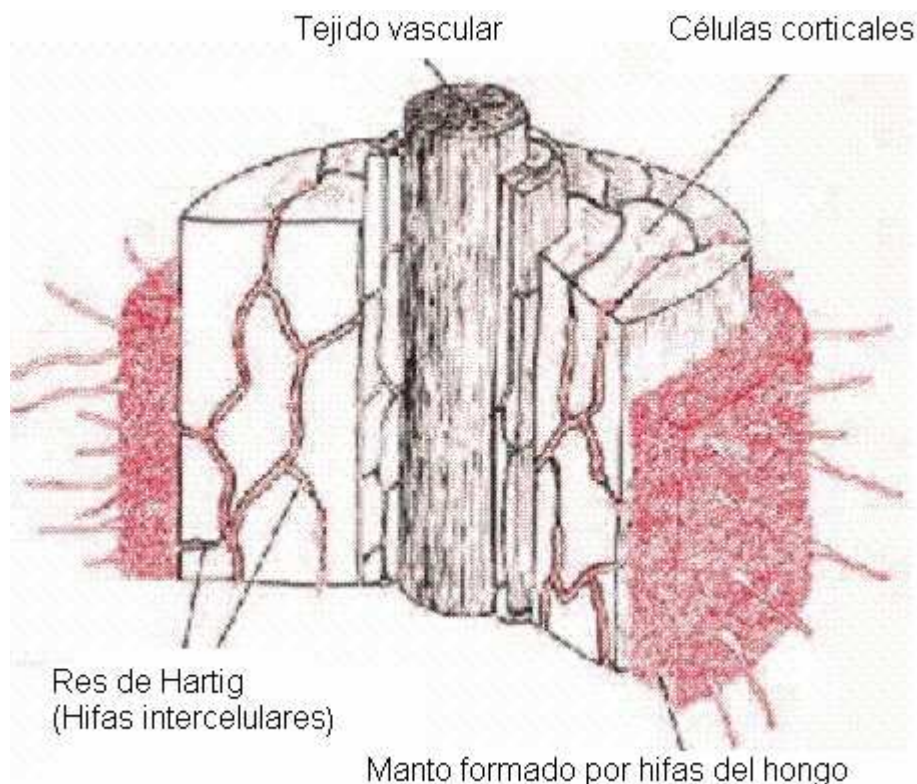


Figura 2.8: Estructura de la interacción de los hongos ectomicorrícicos (Modificado de Hemard *et al.*, 2008).

La simbiosis ectotrófica sólo se desarrolla en raíces secundarias, cortas y de crecimiento limitado. Mientras se desarrolla la micorriza, el hongo excreta sustancias reguladoras del crecimiento, causando cambios en el sistema de ramificación. Las raíces aparecen entonces hinchadas, más cortas, romas, ramificadas y sin pelos radicales. La función de absorción de agua y nutrientes, ahora la realiza el entramado de hifas, que desde el manto, penetran en el suelo (Raven, 1999; Izco, 2004).

En términos nutricionales y fisiológicos, esta relación mutualista provee al hongo constantemente de carbohidratos, tanto diméricos como monoméricos, producidos por la planta en la fotosíntesis; y vitaminas producidas en otras funciones internas de la planta, las cuales no pueden ser producidas por los hongos. Estos compuestos son transportados desde su fuente de producción, las hojas, hasta las

raíces, donde los hongos los captarán (entre el 10 % y el 30 % de lo que las plantas producen en total), a cambio, la planta puede utilizar la amplia red de micelios del hongo, para captar agua y/o nutrientes desde el suelo, mejorando sus capacidades de captación y aumentando su tolerancia al estrés biótico y abiótico. Estas asociaciones permiten a las plantas acceder a captar iones que están inmovilizados en el suelo, especialmente en pH básico (Australian National Herbarium, 2009; URGI, 2009).

El mejoramiento de la captación de nutrientes, gracias a la simbiosis ectomicorrícica conectada intercelularmente con la planta, se explica tanto física como químicamente. El diámetro de los micelios de los hongos es mucho más pequeño que las raíces más pequeñas de las plantas y pueden recorrer mayores espacios de suelo, dotándose de una superficie de captación mucho más grande. Además, la química de la pared celular de los hongos es distinta a la de la planta permitiendo más captación de nutrientes, ya que la quitina presente en la célula fúngica permite que los micelios sean mucho más permeables, que las células vegetales, debido a que la molécula de quitina es más pequeña que la molécula de celulosa (Australian National Herbarium, 2009; URGI, 2009).

## **2.6. Diversidad de hongos**

Los hongos que forman las ectomicorrizas son principalmente Basidiomicetos (con unas 5.000 especies), Ascomicetos y Zigomicetos, incluyendo muchos de los hongos macromicetos forestales (hongos con “pie”), y los *Sclerodermatales* (hongos sin “pie”), así como el hongo hipógeo que fructifica bajo tierra, conocido como trufa. Géneros de hongos bien conocidos que forman ectomicorrizas son *Amanita*, *Boletus*, *Hebeloma*, *Laccaria*, *Lactarius*, *Pisolithus*, *Rhizopogon*, *Russula*, *Scleroderma*, *Suillus* y *Tricholoma* (todos Basidomicetos), y *Cenococcum* y *Tuber* (Ascomicetos) (Izco, 2004; Australian National Herbarium, 2009).

Las ectomicorrizas son relativamente poco frecuentes, entre un 3% y un 5% de las plantas terrestres establecen esta simbiosis, aunque su valor radica en que lo presentan las plantas de importancia forestal (pinos, robles, abedules, encinas, sauces, nogales, entre otros) (Izco, 2004).

## **2.7. *Suillus luteus***

*Suillus luteus*, también conocido en Chile como boleto o callampa del pino, pertenece al orden *Boletales* (tabla N° 2.1), crece bajo pinos de diversas especies, asociado a sus raíces y aparece durante el otoño y el invierno.

Morfológicamente tiene un sombrero convexo, que puede superar los 12 cm de diámetro, color pardo oscuro, una superficie muy viscosa (debido a un revestimiento mucilaginoso), un borde bastante regular y en etapa juvenil es frecuente encontrarlo con restos del velo parcial (figura 2.9). Posee tubos decurrentes, redondeados, de color amarillo claro y bastante largos. El pie es blanquecino cilíndrico, de tamaño proporcional al del sombrero, con un anillo membranoso amplio de color blanco violáceo, por debajo del anillo es viscoso y granuloso; por arriba, de carne gruesa, blanquecina o amarillenta, sin olor o sabor particular (figura 2.9). La carne es espesa, pero tierna, más fibrosa en el pie, de color amarillo pálido. Es una especie comestible de buena calidad por lo compacto de su carne y su discreto rendimiento, aunque se debe retirar la piel del sombrero para evitar problemas estomacales (Asociación Micológica de Durango, 2009; Red naturaleza, 2009).

Tabla 2.1: Clasificación científica *Suillus luteus*.

Clasificación	Nombre Científico
Dominio:	<i>Eucarya</i>
Reino:	<i>Fungi</i>
Filo:	<i>Basidiomycota</i>
Clase:	<i>Homobasidiomycetes</i>
Orden:	<i>Boletales</i>
Familia:	<i>Suillaceae</i>
Genero:	<i>Suillus</i>
Especie:	<i>S. luteus</i>

(Encyclopedia of Life, 2009)

Figura 2.9: Hongos *Suillus luteus* (Kuo, 2004).

Las características macroscópicas y microscópicas de los cultivos *in vitro* de este tipo de hongos, según Sanchez *et al.* (2000) son: Micelio pardo, pardo-

anaranjado o algunas veces con tonalidades rosáceas. Micelio aéreo blanco, muy abundante, de aspecto algodonoso y distribuido por toda la colonia sobrepasando el micelio basal, margen irregular de color crema, reverso pardo o pardo-amarillento. El diámetro de la colonia tras cuatro semanas de crecimiento es de 4 cm. Hifas hialinas o ligeramente pardo-amarillentas, de paredes finas, algunas flexuosas, de 1,5 a 6,5  $\mu\text{m}$  de diámetro. Presentan engrosamientos intercalares de hasta 12  $\mu\text{m}$ .

## **2.8. Cultivo de *Suillus luteus***

*Suillus luteus* crece generalmente más lento que los basidiomicetes no micorrícicos cultivados *in vitro*. Experiencias realizadas por Sasek y Musilek (1971) en medio de cultivo sólido, demuestran el lento crecimiento de este hongo.

Las técnicas de cultivo *in vitro* de organismos vivos, tales como el cultivo en medio sólido, el cultivo sumergido en medio líquido en frascos, el cultivo sumergido en medio líquido en reactores, etc., pueden ser aplicadas en el cultivo de hongos ectomicorrícicos. Esta clase de hongos crece de forma diferente en cultivos sumergidos, que en cultivos sólidos.

En cultivos realizados en fermentadores y frascos agitados orbitalmente, la morfología de los micelios de estos hongos es de pellets. La morfología es importante en cultivos sumergidos para determinar el crecimiento de biomasa de estos organismos, la imperfecta forma de crecimiento tiende a generar un crecimiento no-uniforme dentro del medio de cultivo. Sasek (1989) demostró en sus cultivos en frascos estacionarios, frascos con agitación orbital y en un fermentador de 20 litros con 10 litros de volumen utilizado, que es posible obtener una cinética de crecimiento similar a la de microorganismos, pues se obtuvieron pellets con forma esférica que no perdieron su estructura en el medio de cultivo, (como se puede apreciar en la figura 2.10). Estos pellets son cuantificables a través de peso seco para determinar su biomasa y deben ser recolectados representativamente desde las fermentaciones para la validez de estas experiencias.

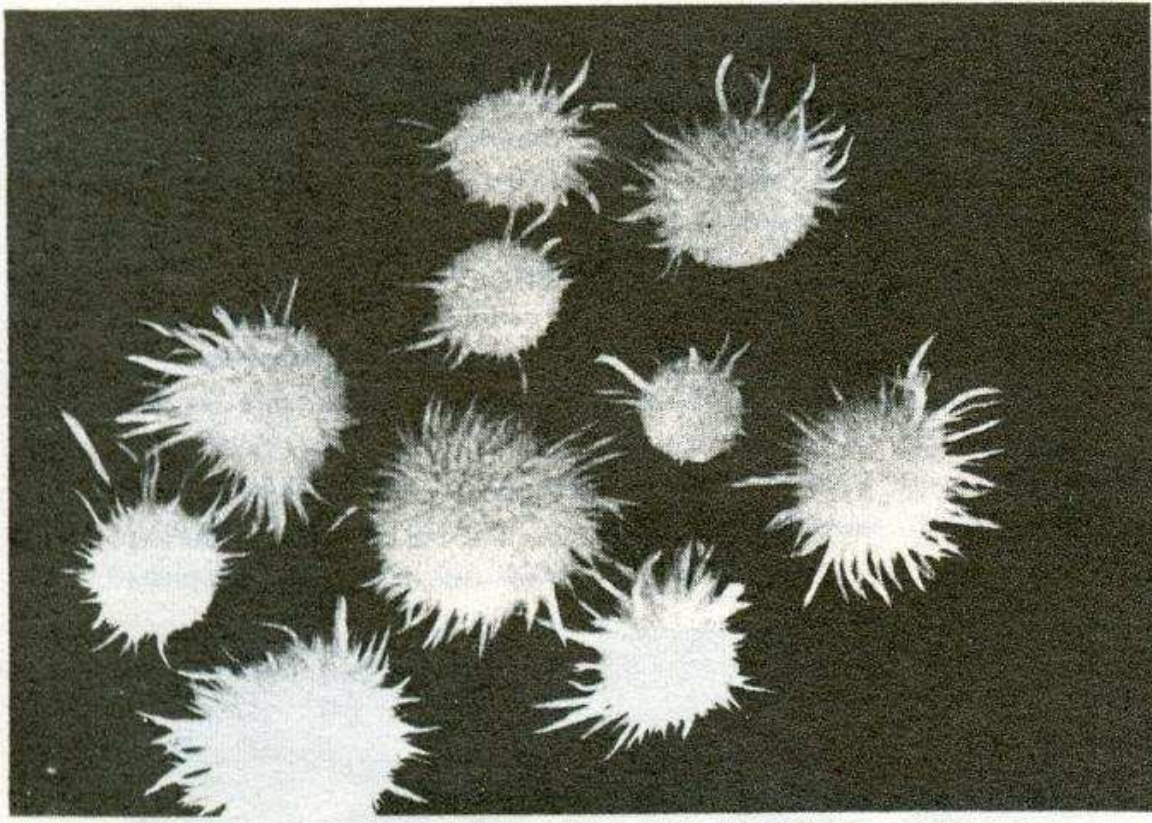


Figura 2.10: Pellets de *Suillus luteus*, a partir de cultivo sumergido (Sasek 1989).

La forma y estructura de estos pellets está dada por las fuerzas de agitación, fuerza de corte, etc. presentes dentro del reactor, las cuales constantemente cortan los micelios y generan nuevos puntos de crecimiento. Las estructuras de pellets en la figura 2.10 son micelio que se dan por el constante crecimiento dentro del reactor, gracias a la gran cantidad de nutrientes presentes (Sasek, 1989).

Las técnicas que actualmente son utilizadas para el cultivo de microorganismos de interés industrial, pueden ser adaptadas para la producción de hongos ectomicorrícicos e inoculantes biológicos más elaborados. El cultivo líquido de estas especies representa una mejora considerable en ocupación de tiempo y espacio, logrando productividades mayores con menos esfuerzos, además se tiene

la capacidad de poder escalar estos procedimientos hasta niveles industriales (Sasek y Musílek, 1971; Sasek, 1989).

La información sobre el cultivo de esta clase de hongos es escasa actualmente, si se pretende generar aplicaciones a gran escala para hongos ectomicorrícicos, se debe contar con información acabada sobre la fisiología, bioquímica y parámetros de crecimiento de estos organismos (Rossi, 2006).

Las técnicas de cultivo sumergido de hongos ectomicorrícicos, proveen de una alternativa atractiva para la producción de inóculos, ya que además de ser capaces de optimizar la utilización de recursos para el cultivo, permiten también el control de las condiciones de cultivo, tales como: pH, temperatura, oxígeno disuelto, velocidad de agitación, etc. (Rossi, 2006).

El estudio de Rossi (2006), logra describir con gran detalle las necesidades y condiciones pertinentes para el cultivo de estos organismos, además de determinar los parámetros de la cinética de crecimiento para esta clase de organismos. Esto se basó en una serie de experimentos de caracterización de parámetros de crecimiento y desarrollo de una tecnología para el cultivo de seis especies de hongos ectomicorrícicos en reactores Airlift.

Senior *et al* (1992), en su investigación, logra producir micelio de dos especies de hongos ectomicorrícicos, en cultivo por lotes, para aplicarlo como inóculo biológico en plantas, determinó su crecimiento a través de la cuantificación de biomasa por peso seco y analiza la dependencia del pH sobre el crecimiento en el tiempo. En este estudio se trabajó en el crecimiento controlado desde cultivos sólidos, en el crecimiento en reactor y su aplicación en plantas, completando así el ciclo de producción y aplicación del hongo a escala de laboratorio.

El estudio de Kuek (1996) masificó *Laccaria laccata*, cuantificando la biomasa, a través de peso seco. Allí se analizó la dependencia del pH con respecto al

crecimiento de biomasa en el medio y se cuantifica la cantidad de glucosa residual en el medio. En una etapa de crecimiento en frascos con agitación, se analizó la dependencia de sales de fosfato y concentración de glucosa en el medio para la producción de biomasa, además se determinaron parámetros de crecimiento tales como productividad de biomasa y se analizaron como parte del cultivo en frascos.

En Carrillo *et al* (2004), fueron capaces de masificar, en reactor, dos especies de hongos ectomicorrícicos, incluyendo una variedad de *Suillus* y determinaron su crecimiento a través de la cuantificación de Ergosterol, como un compuesto asociado a la pared fúngica y que se suele utilizar para la cuantificación de ectomicorrizas en raíces de plantas.

Sasek y Musílek (1971) reportó crecimientos de biomasa en cultivo sólidos e inoculaciones concordantes con las presentadas para esta investigación.

El estudio de Musilek *et al.* (1969) reportó mediciones y resultados significativamente similares a los esperados en esta investigación con el hongo *Oudemansiella mucida*.

Finalmente uno de los pocos autores que investigó sobre las cualidades del cultivo de *Suillus luteus* en fermentadores y frascos con agitación fue Sasek (1989), quien obtuvo curvas de crecimiento para estas dos modalidades de cultivo, en fermentaciones de 30 días, con máximos de biomasa superiores a 10 g/L.

## **2.9. Medio de cultivo**

En el cultivo de especies fúngicas, especialmente hongos ectomicorrícicos, existe una gran variedad de medios de cultivos capaces de entregar las condiciones apropiadas para el crecimiento de estos organismos, el medio de cultivo que se utiliza con más frecuencia es el MMN (Medio Melin-Norkrans), aunque se ha demostrado que otros medios de cultivo pueden proveer a los hongos de nutrientes

con mayor eficiencia en su crecimiento (medios: BAF, Biotina Aneurina ácido Fólico; SAB, Sabouraud Agar; EMA, Extracto de Malta) (Rossi, 2006). La composición de los medios de cultivo se especifica en la tabla N° 2.2.

Tabla 2.2: Formulación de medios de cultivo específicos para hongos.

<b>Nutrientes</b>	<b>MMN</b>	<b>SAB</b>	<b>BAF</b>	<b>EMA</b>
		<b>glucosa</b>		
Extracto de papa		4 g		
Extracto de Malta	3 g			30 g
d – Glucosa	10 g	20 g	30 g	
Peptona		10 g	2 g	5 g
Extracto de levadura			0,2 g	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,25 g			
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g	1 g	0,5 g	
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0,15 g	1 g	0,5 g	
CaCl <sub>2</sub>	0,05 g		100 mg	
FeCl <sub>3</sub>	10 mg		10 mg	
NaCl	0,025 g			
MnSO <sub>4</sub> * 4 H <sub>2</sub> O			5mg	
ZnSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O			1 mg	
Acido Fólico			0,1 mg	
Biotina			0,001 mg	
Inositol			50 mg	
Tiamina	0,1 mg			
Tiamina HCl			0,05 mg	
Agua Destilada	1.000 mL	1.000 mL	1.000 mL	1.000 mL

(Santiago-Martínez *et al*, 2003).

Fundamentalmente se diferencian en la concentración y presencia de fuentes de carbono, presencia de vitaminas vegetales y presencia de micro-nutrientes, como se puede ver en la tabla 2.2 (Rossi, 2006).

## 2.10 Condiciones de cultivo

Son pocos los estudios publicados sobre el cultivo sumergido para la producción de biomasa de hongos ectomicorrícicos utilizando reactores. Por otra parte, no existen estudios que informen sobre los resultados obtenidos para operaciones por lote alimentado o cultivo continuo, aunque se puede concluir rápidamente que el cultivo continuo sería poco eficiente por las bajas velocidades de crecimiento de los hongos. Es necesario generar información sobre experiencias relacionadas con el tema e innovaciones en las técnicas ya existentes para cultivos por lotes (Rossi, 2006).

Tabla N° 2.3: Condiciones de cultivo previamente utilizadas.

Autor	Condiciones de cultivo		
	Temperatura	Aireación	Agitación
Senior <i>et al</i> (1992)	25 °C	100% y 50 % Oxígeno disuelto	150 rpm
Kuek (1996)	25 °C	No informada	200 rpm
Carrillo <i>et al</i> (2004)	23 °C	60% Oxígeno disuelto	100 rpm
Sasek <i>et al</i> (1971)	20 °C	No informada	No informada
Musilek <i>et al</i> (1969)	23±2 °C	No informada	350 rpm
Sasek (1989)	24 °C	8 L/minuto	200 rpm

Rossi (2006), en su estudio, utilizó una temperatura de 25±1° C, en ausencia de luz para sus cultivos en placas Petri, y utilizó una temperatura de 25±1° C, en

matraces Erlenmeyer de 250 mL., con inóculos de discos de micelio-agar de 7 mm. de diámetro aproximadamente, considerando entre 5 a 8 por frasco y cultivados en ausencia de luz. Además utilizó una temperatura de  $25\pm 1^{\circ}$  C, con inóculos de 0,25 g/L, 300 rpm y 0,27 vvm (volumen de aire por volumen de líquido por minuto) para su cultivo en reactor. En la tabla N° 2.3, se informan condiciones similares a las recién presentadas.

## **CAPITULO 3**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Selección del inóculo ectomicorrícico de *Suillus luteus***

Según el aislamiento de INFOR, se seleccionó la especie fúngica utilizada considerando su alta velocidad de crecimiento, previamente demostrada. A su vez se optó por la utilización de un aislamiento de *S. luteus* con alta velocidad de crecimiento (CTPF, 2009).

#### **3.2. Medio de cultivo**

Los medios de cultivo utilizados fueron el BAF (Biotina Aneurina ácido Fólico), utilizado por Kuek (1996) y MMN (Medio de Melin-Norkrans) modificado, utilizado por Rossi (2006). Ambos medios fueron ajustados a pH 5,8. La composición se presenta en la tabla 3.1 (Kuek, 1995; Rossi, 2006).

Tabla 3.1: Formulación de medios de cultivo.

Nutrientes	BAF	BAF	MMN
	Líquido	Sólido	Modificado
Glucosa	15 g	30 g	15 g
Peptona	2 g	2 g	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>			0,75 g
Extracto de levadura	0,2 g	0,2 g	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g	0,5 g	1,5 g
MgSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	0,5 g	0,5 g	0,45 g
CaCl <sub>2</sub>	100 mg	100 mg	0,15 g
FeCl <sub>3</sub>	10 mg	10 mg	30 mg
NaCl			0,075 g
MnSO <sub>4</sub> • 4 H <sub>2</sub> O	5mg	5mg	
ZnSO <sub>4</sub> • 7H <sub>2</sub> O	1 mg	1 mg	
Acido Fólico	0,1 mg	0,1 mg	
Biotina	0,001 mg	0,001 mg	
Inositol	50 mg	50 mg	
Tiamina HCl	0,05 mg	0,05 mg	0,3 mg
Agua Destilada	1.000 ml	1.000 ml	1.000 ml
Agar		15 g	

(Santiago-Martínez *et al.*, 2003)

### 3.3. Esterilización

La esterilización se realizó de la forma que se indica a continuación (Kuek, 1995; Rossi, 2006; Vignoli, 2006):

- Los medios de cultivo y los utensilios utilizados en los procesos de inoculación fueron esterilizados en autoclave a 121°C y 1 Atmósfera de presión manométrica, durante 15 minutos.

- Las placas, los frascos y todo el material de vidrio implicado en el cultivo del hongo fue esterilizado en autoclave a 121°C y 1 Atmósfera de presión manométrica, durante 15 minutos.
- El reactor, previamente ensamblado, fue esterilizado en autoclave a 121°C y 1 Atmósfera de presión manométrica, durante 15 minutos.
- Los protocolos de cultivo, inoculación y manejo del hongo, fueron realizados en ambiente estéril bajo una cámara de flujo laminar.
- La desinfección directa de las superficies donde se trabajó con el hongo fue realizada con alcohol al 70%.
- Los instrumentos de corte de trozos de micelio-agar fueron esterilizados en autoclave a 121°C y 1 Atmósfera de presión manométrica, durante 15 minutos. Además fueron desinfectados con alcohol al 70% y fuego directo de un mechero.

### **3.4. Protocolos de cultivo**

El proceso de inoculación y de cultivo del hongo fue estandarizado para reducir las probabilidades de variaciones estadísticas asociadas a las metodologías utilizadas. Se estandarizaron los protocolos, los cuales se describen a continuación.

#### **3.4.1. Stock inicial**

Se utilizaron los aislamientos existentes en el banco de cepas de INFOR. Las variedades fúngicas ahí presentes fueron preservadas en placas Petri, con medio de cultivo MMN y replicadas periódicamente para mantener su actividad.

### **3.4.2. Cultivo en placas**

Se propagó el hongo en placas Petri con medio de cultivo BAF Sólido, como se indicó en la tabla 3.1.

### **3.4.3. Metodología de corte de trozos de micelio-agar**

Se estandarizó el corte de trozos de micelio-agar de forma que todos los inóculos fueran equivalentes. Se analizaron los pesos secos de los trozos y se vincularon con el crecimiento radial registrado para cada muestra. Por lo tanto, se obtuvieron biomásas iniciales para las experiencias realizadas en los frascos y el reactor.

### **3.4.4. Inoculación en frascos**

La técnica se estandarizó con un cilindro de 9 milímetros de radio interno. Se procedió a inocular los frascos con dos discos de micelio-agar de 9 milímetros. Por lo tanto, este inóculo contempló dos discos de  $2,5 \text{ cm}^2$  aproximadamente cada uno, para completar un área total de  $5 \text{ cm}^2$  aproximadamente, equivalentes en peso seco a 0,055 gramos en promedio. El hongo fue inoculado en 50 mL de medio cultivo MMN líquido como se indica en la tabla 3.1, alcanzando una concentración inicial de 1,11 g/L (Rossi, 2006).

### **3.4.5. Inoculación en reactor**

La técnica se estandarizó con cortes, realizados con bisturí en ambiente estéril, de micelio-agar de  $1 \text{ cm}^2$  aproximadamente. Se inocularon al reactor 55 trozos de micelio-agar de  $1 \text{ cm}^2$  aproximadamente cada uno. Esta muestra contempló un área total de  $55 \text{ cm}^2$  aproximadamente, equivalentes en peso seco a 0,6 gramos. El hongo fue inoculado en 3,5 litros de medio de cultivo BAF líquido como se indica en la tabla 3.1, alcanzando una concentración inicial de 0,17 g/L (Rossi, 2006).

### 3.5. Reactor

Se utilizó un reactor LiFlus GM de BIOTRON Inc., con un vaso de 5 litros de capacidad útil. Este se puede apreciar en la figura 3.1 (Biotron, Inc., 2009).



Figura 3.1: Reactor LiFlus GM de BIOTRON (Biotron Inc).

### 3.6. Condiciones de cultivo y operación

Los hongos ectomicorrícicos no esporulan en cultivo sumergido, sólo lo hacen a través de sus cuerpos frutales (carpóforo), por lo que el cultivo de tejidos de estos hongos se realizó por medio de su micelio cultivado, el cual se utilizó para inocular cada uno de los medios de cultivo en las experiencias realizadas (Rossi, 2006).

### **3.6.1. Cultivo en placas**

El hongo cultivado en placas Petri con medio de cultivo BAF sólido ajustado a un pH de 5,8 (tabla 3.1), fue expuesto a 23°C de temperatura, en ausencia de luz (Rossi, 2006).

### **3.6.2. Cultivo en frascos**

Se realizaron cinéticas de crecimiento a 10°C, 23°C y 30°C, a fin de cuantificar la dependencia del crecimiento de biomasa con la temperatura y determinar los parámetros de crecimiento en frascos. Las experiencias se realizaron en frascos de 250 mL de capacidad con 50 mL de medio de cultivo MMN modificado como se indica en la tabla 3.1 y se cultivaron a 125 rpm de agitación orbital. Se realizaron análisis seriados en el tiempo donde se cuantificó la biomasa y la concentración de sustrato (Glucosa) residual en triplicado. Los frascos se inocularon con 1,11 g/L promedio de micelio de hongo previamente cultivado en placas. Para determinar la dependencia del crecimiento de la biomasa con la temperatura, se realizaron cuantificaciones cada 4 días, por un periodo de 12 días de cultivo. Para determinar los parámetros de crecimiento en frascos, se realizaron cuantificaciones cada 4 días, por un periodo de 24 días de cultivo. Además, para caracterizar el crecimiento en frascos, se cuantificó la proteína extracelular y la variación de pH en el tiempo (Musílek *et al*, 1969; Rossi, 2006).

### **3.6.3. Cultivo en reactor**

El proceso se realizó en un reactor LiFlus GM de BIOTRON Inc., de 5 litros de capacidad útil (Fig. 3.1). La fermentación se realizó por lotes a 23°C de temperatura, en ausencia de luz, con medio de cultivo BAF líquido ajustado a un pH de 5,8 y mantenido durante la fermentación, a través, de la adición controlada de hidróxido de potasio y ácido clorhídrico, como se indica en la tabla 3.1, con una agitación de 100

rpm y un flujo de aire de 2 L/minuto. El inóculo inicial fue de 0,17 g/L como se indicó anteriormente (Rossi, 2006; Vignoli, 2006).

### **3.7. Obtención de muestras**

Se utilizaron dos modalidades de toma de muestras considerando cultivo en frascos y cultivo en reactor (Rossi, 2006).

#### **3.7.1. Cultivo en frascos**

Se utilizó una metodología, donde se tomó el contenido total de los frascos en triplicado y se analizaron los parámetros de pH, proteína extracelular, sustrato (Glucosa) residual y biomasa (Rossi, 2006).

#### **3.7.2. Cultivo en reactor**

Se utilizó una metodología, donde se tomaron muestras de 50 mL aproximadamente en triplicado y se analizaron los parámetros de sustrato (Glucosa) residual y biomasa (Rossi, 2006).

### **3.8. Determinación de sustrato**

Se determinó, específicamente a través de la prueba enzimática calorimétrica de glucosa, con el método GOD-PAP sin desproteinización, del kit de medición de glucosa GLUCOSE liquicolor de HUMAN GMBH (HUMAN GMBH, 2009). Los análisis se realizaron para los cultivos en frasco con agitación y cultivo en reactor, a partir de las muestras obtenidas y filtradas al vacío, ANEXO 1.

Procedimiento:

- Se llevó a cabo en tubos eppendorf,
- Se agregaron 10  $\mu$ L de la muestra diluida de cada una de las muestras del triplicado,
- Se agregaron 1000  $\mu$ l del reactivo del kit, en cada una de las muestras del triplicado,
- Se mantuvieron durante 5 minutos a 37°C,
- Se determinó la absorbancia a 500 nm,
- Paralelamente se realizó una curva de calibrado con glucosa hasta 1 g/L, y
- Se calcularon las concentraciones de glucosa residual a partir de la regresión lineal de los puntos de la curva de calibrado.

### **3.9. Determinación de proteína**

La proteína extracelular es un producto comúnmente producido en las fermentaciones de organismos vivos. Esta se cuantificó a través del método de Lowry, que consiste en un análisis colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas, siendo la intensidad de color de la disolución resultante proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert-Beer (Lowry *et al.*, 1951).

Los análisis se realizaron para la cinética de crecimiento, donde se determinaron los parámetros de crecimiento, a partir de las muestras obtenidas y filtradas al vacío, ANEXO 4.

Reactivos según Lowry *et al* (1951):

- Reactivo A:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2%, NaOH 0,1 M
- Reactivo B<sub>1</sub>:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 1%
- Reactivo B<sub>2</sub>: tartrato sódico-potásico al 2%
- Reactivo C: Se preparó en el momento de iniciar el ensayo, mezclando A, B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> en proporciones 50:0,5:0,5 (en volumen)
- Reactivo Folin-Ciocalteu: reactivo comercial diluido a 1/4

Procedimiento según Lowry *et al*, (1951):

- Se llevó a cabo en tubos de ensayo;
- Se agregaron 1 mL de la muestra diluida de cada una de las muestras en triplicado;
- Se agregaron 5 ml del reactivo C, en cada una de las muestras en triplicado;
- Se mantuvieron en reposo durante 10 minutos en oscuridad;
- Se agregaron 0,5 ml del reactivo Folin-Ciocalteu diluido en cada una de las muestras del triplicado;
- Se mantuvieron en reposo durante 20 minutos en oscuridad;

- Se determinó la absorbancia a 580 nm;
- Paralelamente se realizó una curva de calibrado con albúmina de suero bovino (BSA) hasta 1 g/L;
- Se calcularon las concentraciones de proteína a partir de la regresión lineal de los puntos de la curva de calibrado.

### **3.10. Determinación de variación de pH**

Se registró la variación del pH en los cultivo en frascos según los datos del electrodo de pH presente en el laboratorio y se analizó la dependencia del crecimiento con este parámetro (Musílek *et al*, 1969; Kuek, 1995).

### **3.11. Determinación de biomasa**

Para el cultivo, tanto en frascos como en el reactor, se determinó la concentración celular a través del análisis de peso seco.

Procedimiento según Kuek (1995) y Rossi (2006):

- Se obtuvieron muestras a partir del cultivo en frascos y del cultivo en reactor;
- Se filtraron al vacío las muestras con papel filtro seco y previamente pesado;
- Se cuantificó el volumen extraído;
- Se llevaron a estufa de secado (75°C) por un mínimo de 48 horas.

La concentración celular entonces se calculó a través de la siguiente ecuación,  
ANEXO 2:

$$X = \frac{(M_{a+f} - M_f)}{V_a} \quad (3.1)$$

Donde: X = Concentración de biomasa (g/L)  
M<sub>a+f</sub> = Masa de la muestra seca + masa del papel filtro  
M<sub>f</sub> = Masa del papel filtro  
V<sub>a</sub> = Volumen de la muestra

### 3.12. Determinación de parámetros

Se determinaron los parámetros correspondientes al crecimiento de biomasa según las variables medidas experimentalmente en frascos con agitación y el reactor.

#### 3.12.1. Velocidad específica de crecimiento

Se determinó según la regresión lineal del logaritmo natural de los datos de biomasa encontrados en la zona exponencial de crecimiento según peso seco, ANEXO 3 (Rossi, 2006).

### 3.12.2. Rendimiento de sustrato en biomasa

Se determinó según los datos obtenidos de sustrato y biomasa a través de peso seco, considerando la siguiente ecuación, ANEXO 3 (Acevedo, 2002; Rossi, 2006):

$$Y_{x/s} = \frac{(X - X_0)}{(S_0 - S)} \quad (3.2)$$

Donde:  $Y_{x/s}$  = Rendimiento de sustrato en biomasa  
 $X$  = Concentración de biomasa (g/L)  
 $X_0$  = Concentración de biomasa al inicio del cultivo (g/L)  
 $S$  = Concentración de sustrato (g/L)  
 $S_0$  = Concentración de sustrato al inicio del cultivo (g/L)

### 3.12.3. Tiempo de duplicación de biomasa

Se determinó según los datos obtenidos de biomasa a través de peso seco, considerando la siguiente ecuación, ANEXO 3 (Acevedo, 2002; Rossi, 2006):

$$t_{dup} = \frac{\ln 2}{\mu_M} \quad (3.3)$$

Donde:  $t_{dup}$  = Tiempo para duplicación de biomasa (día)  
 $\mu_M$  = Velocidad específica de crecimiento máxima (día<sup>-1</sup>)

### 3.12.4. Productividad de biomasa

Se determinó según los datos obtenidos de biomasa a través de peso seco, considerando la siguiente ecuación, ANEXO 3 (Acevedo, 2002; Rossi, 2006):

$$Q_x = \frac{(X_m - X_o)}{t_f} \quad (3.4)$$

Donde:  $Q_x$  = Productividad de biomasa (g/L día)

$X_m$  = Concentración de biomasa (g/L)

$X_o$  = Concentración de biomasa al inicio del cultivo (g/L)

$t_f$  = Tiempo total de cultivo (día)

Se calculó tanto el valor de Productividad de biomasa total considerando los valores de consumo de sustrato y producción de biomasa totales, como el de Productividad de biomasa máxima considerando los valores de consumo de sustrato y de producción de biomasa en la parte exponencial de las cinéticas.

## CAPITULO 4

### RESULTADOS

#### 4.1 Determinación de temperatura de cultivo en frascos

La dependencia del crecimiento de *Suillus luteus* con la temperatura fue evaluada hasta los 12 días de cultivo. Los resultados encontrados fueron los siguientes:

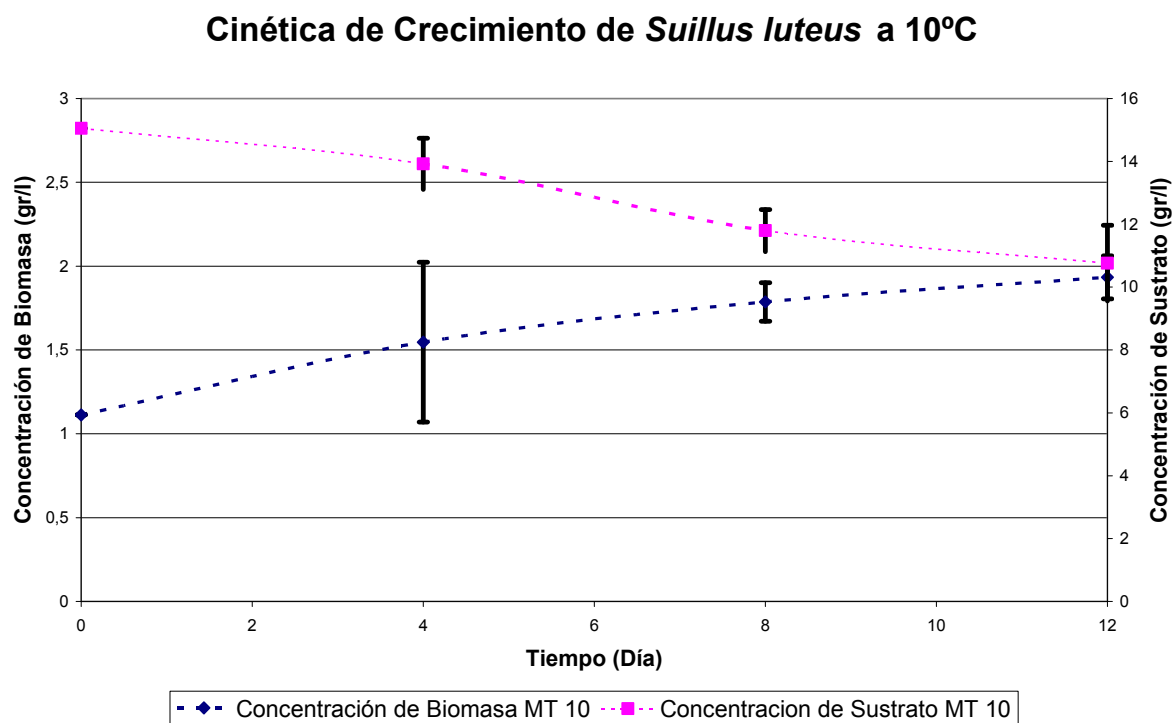


Figura 4.1: Cinética de crecimiento de *Suillus luteus* a 10°C, en frascos.

La figura 4.1 presenta los resultados del crecimiento a 10°C, en medio MMN. En ésta se puede apreciar que en el período de cultivo, se obtuvieron 1,9 g/L de biomasa y una disminución de 4 g/L de glucosa, aproximadamente. En el anexo 1 y 2 se presentan las formas de cálculo de la biomasa y del sustrato.

### Cinética de Crecimiento de *Suillus luteus* a 23°C

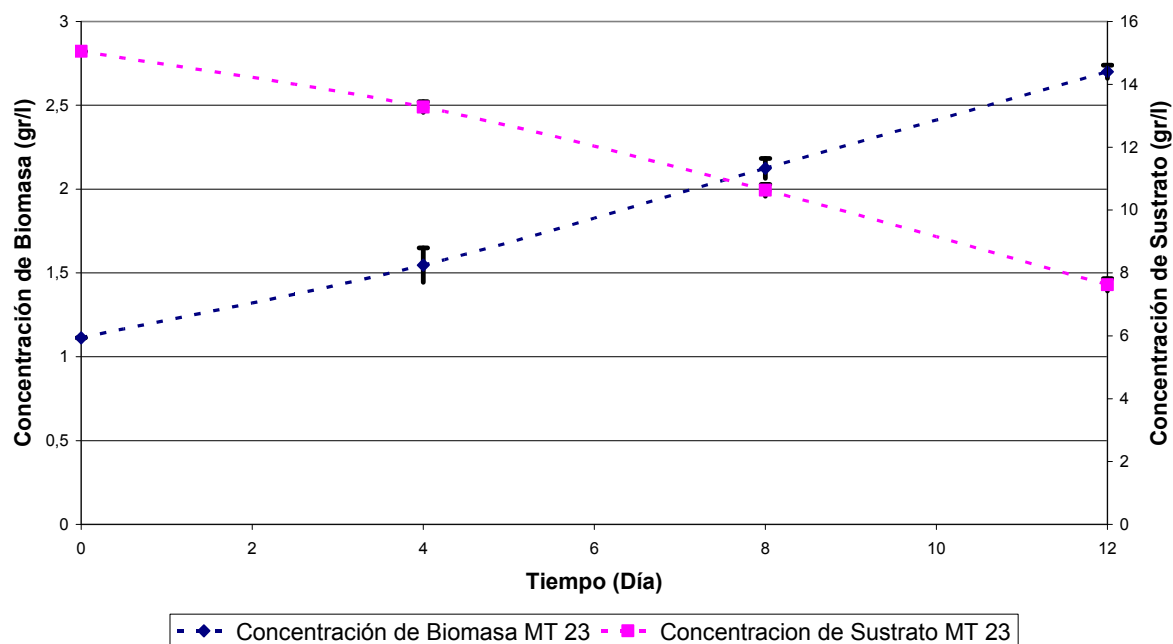


Figura 4.2: Cinética de crecimiento de *Suillus luteus* a 23°C, en frascos.

La figura 4.2 presenta los resultados del crecimiento a 23°C, en medio MMN. En ésta se puede apreciar que en el período de cultivo, se obtuvieron 2,7 g/L de biomasa y una disminución de 6,5 g/L de glucosa, aproximadamente. En el anexo 1 y 2 se presentan las formas de cálculo de la biomasa y del sustrato.

### Cinética de Crecimiento de *Suillus luteus* a 30°C

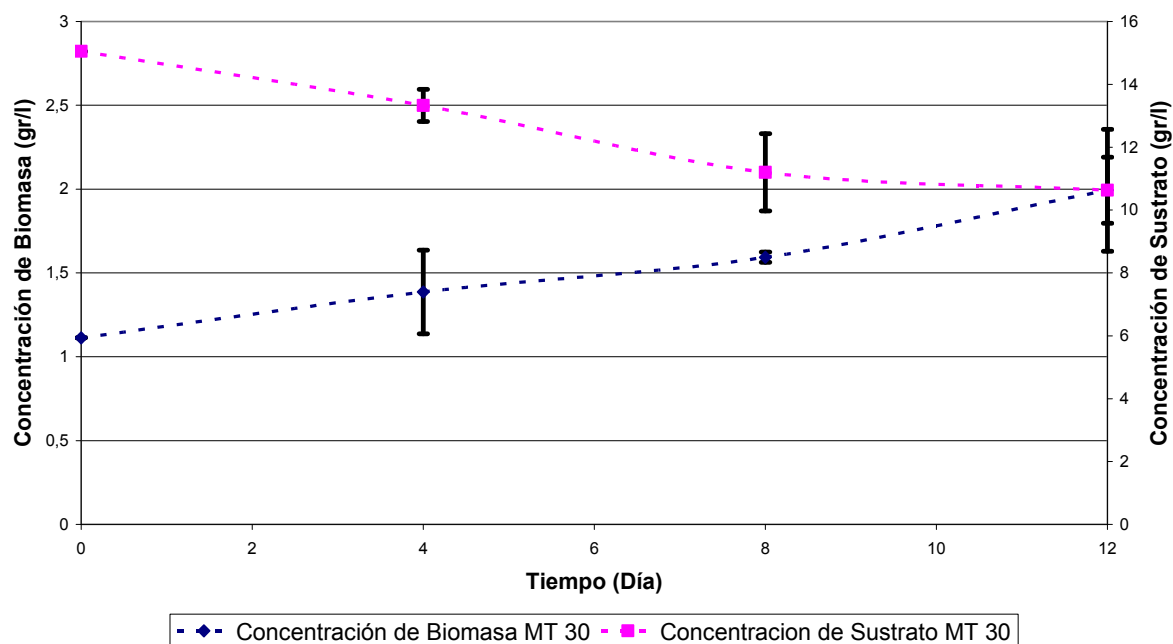


Figura 4.3: Cinética de crecimiento de *Suillus luteus* a 30°C, en frascos.

La figura 4.3 presenta los resultados del crecimiento a 30°C, en medio MMN. En ésta se puede apreciar que en el período de cultivo se obtuvieron 1,99 g/L de biomasa y una disminución de 4,5 g/L de glucosa, aproximadamente. En el anexo 1 y 2 se presentan las formas de cálculo de la biomasa y del sustrato.

Los datos calculados se resumen en la tabla , donde se encontró que el crecimiento a 23°C presenta un  $\Delta X$  de 1,59 g/L, valor superior a los encontrados para los crecimientos de 10°C y 30°C de 0,82 g/L y 0,88 g/L, respectivamente. También se analizó la productividad de biomasa de cada una de las cinéticas realizadas, donde se encontró que el crecimiento a 23°C presenta un  $Q_x$  de 0,1325 g/L día, valor superior a los encontrados para los crecimientos de 10°C y 30°C de 0,069 g/L día y 0,073 g/L día, respectivamente.

Tabla 4.1: Resumen de parámetros cinéticos.

Temperatura	$\Delta X$ (g/L)	$Q_x$ (g/L día)	$Y_{x/s}$
10 °C	0,82	0,069	0,193
23 °C	1,59	0,1325	0,215
30 °C	0,88	0,073	0.201

Debido a estos resultados, es que se determinó trabajar con la temperatura de cultivo de 23°C. A partir de esta experiencia todas las restantes fueron realizadas a 23°C.

## 4.2 Caracterización de la cinética de crecimiento a 23 °C

La determinación de los parámetros de crecimientos para *Suillus luteus*, cultivado en frascos, se realizó en un periodo de 24 días, entregando los siguientes resultados:

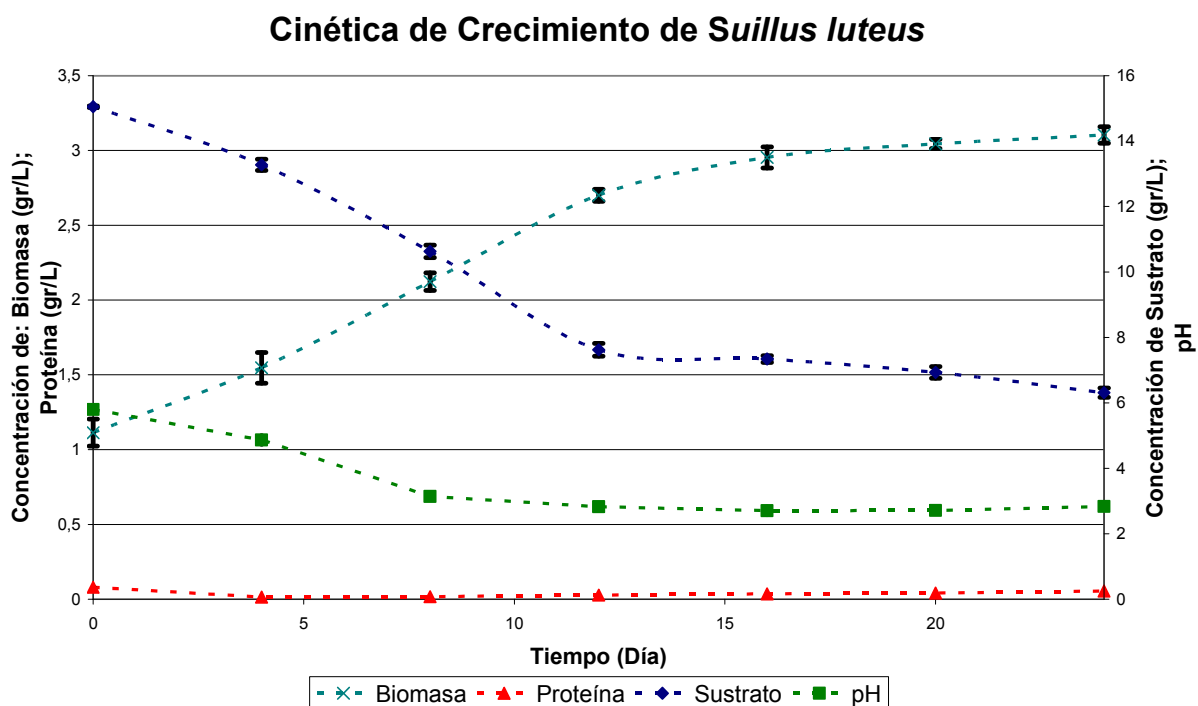


Figura 4.4: Cinética de crecimiento de *Suillus luteus* en frascos, a 23 °C.

La figura 4.4 presenta los resultados de la cinética de crecimiento de biomasa, la disminución de sustrato (Glucosa), producción de proteína y variación de pH en el tiempo de *S. luteus*, en medio MMN, a 23°C, en frascos agitados. En ésta se observa un comportamiento similar al de los microorganismos cultivados por lotes, considerando una etapa de crecimiento exponencial y una etapa de crecimiento estacionario (Acevedo, 2002).

El pH disminuye sustancialmente con el aumento de la biomasa. A pesar de cuantificar la proteína como un probable producto de la fermentación del hongo, no

demostró ser concordante con el crecimiento de la biomasa y ser útil como un parámetro de crecimiento.

La producción de proteína se presentó como un valor poco característico del crecimiento del cultivo, por lo que se determinó no seguir analizando este parámetro en las siguientes experiencias.

Al analizar específicamente los datos de biomasa y sustrato presentados en la figura 4.4, se obtuvieron los parámetros de crecimiento que se presentan a continuación:

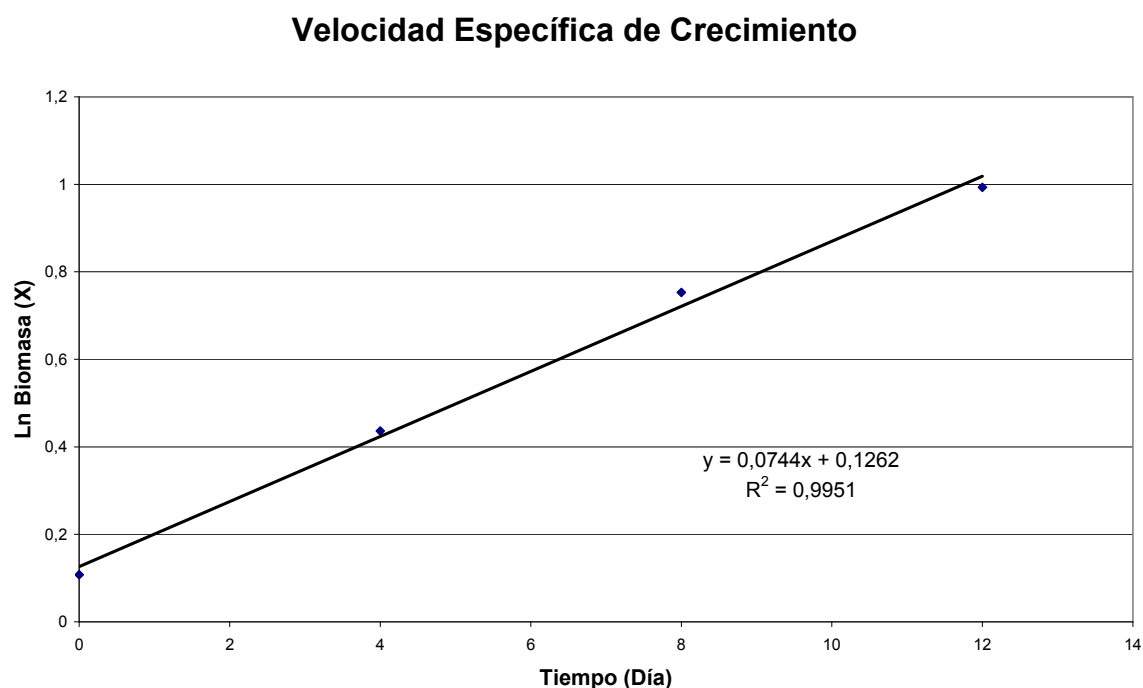


Figura 4.5: Velocidad específica de crecimiento de *Suillus luteus* en frascos.

La figura 4.5 presenta los resultados analizados de velocidad específica de crecimiento, estos analizan los datos de biomasa producida en logaritmo natural, de estos se obtiene el valor de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu_x$ ) al aplicar una regresión lineal a los datos de crecimiento exponencial graficados en relación al

tiempo de cultivo, el valor obtenido de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu_x$ ) es de  $0,074 \text{ día}^{-1}$ .

Es interesante observar que la fase lag de la cinética (fase de acostumbramiento) esta ausente en la representación de las figuras 4.4 y 4.5, esto podría deberse a que esta fase fue muy corta y no se apreció en la primera medición al cuarto día de cultivo. La fase lag sin duda ocurre, ya que es el periodo de acostumbramiento del inoculo al nuevo medio de cultivo, aunque no es apreciable en esta cinética, probablemente, por lo corta que fue en relación al tiempo total de cultivo (Acevedo, 2002; Stanbury, 2003).

### Rendimiento de Sustrato en Biomasa

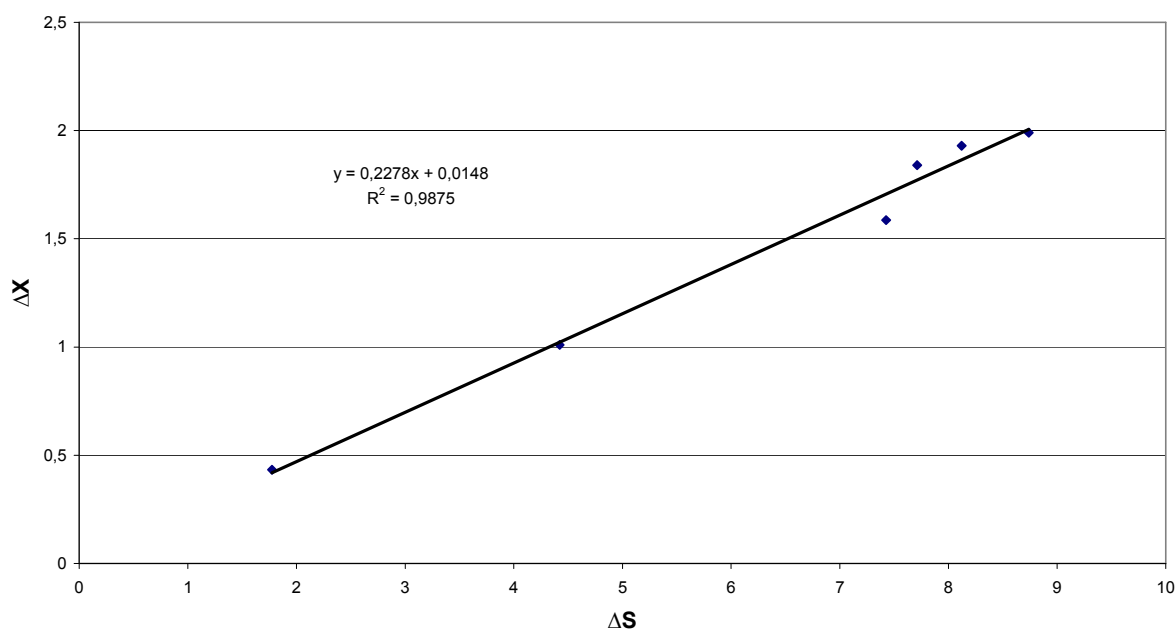


Figura 4.6: Rendimiento de sustrato en biomasa de *Suillus luteus* en frascos.

La figura 4.6 presenta la representación grafica del rendimiento de sustrato en biomasa de la cinética de crecimiento, cuyo valor del rendimiento de sustrato en biomasa ( $Y_{X/S}$ ) es de 0,23, valor calculado según la ecuación 3.2.

Tabla 4.2: Parámetros de crecimiento de *Suillus luteus* en frascos.

Velocidad específica de crecimiento ( $\mu_x$ )	Rendimiento de sustrato en biomasa ( $Y_{X/S}$ )	Tiempo de duplicación ( $T_{dup}$ )	Productividad total de biomasa ( $Q_{X\ TOT}$ )	Productividad máxima de biomasa ( $Q_{X\ MAX}$ )
0,074 día <sup>-1</sup>	0,23	9,321 día	0,083 g/L día	0,132 g/L día

En la tabla 4.1 se presenta un resumen de los parámetros de crecimiento de *Suillus luteus* en frascos: Velocidad específica de crecimiento ( $\mu_x$ ), Rendimiento de sustrato en biomasa ( $Y_{X/S}$ ), Tiempo de duplicación ( $T_{dup}$ ), Productividad total de biomasa ( $Q_{X\ TOT}$ ) y Productividad máxima de biomasa ( $Q_{X\ MAX}$ ). En el anexo 3 se presenta la forma de cálculo de cada uno de estos valores.

### 4.3 Determinación de los parámetros de crecimiento en reactor agitado

La determinación de los parámetros de crecimientos para *Suillus luteus*, cultivado en reactor agitado, se realizó en un periodo de 32 días, entregando los siguientes resultados:

### Cinética de Crecimiento de *Suillus luteus*

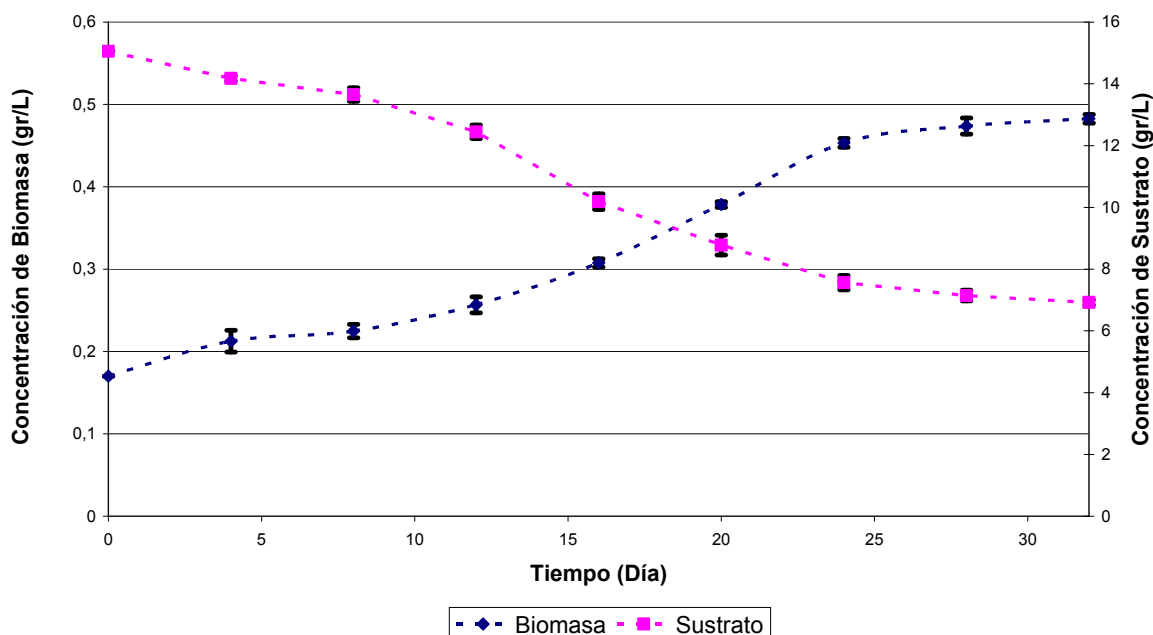


Figura 4.7: Cinética de crecimiento de *Suillus luteus* en reactor agitado.

La figura 4.7 presenta los resultados de la cinética de crecimiento de biomasa y la disminución de sustrato (Glucosa) en el tiempo de *S. luteus*, en medio BAF, a 23°C, a 100 rpm de agitación, 2 L/minuto de aireación, en reactor agitado. En ésta también se observa un comportamiento similar al de los microorganismos cultivados por lotes, considerando una etapa de crecimiento exponencial y una etapa de crecimiento estacionario (Acevedo, 2002).

Los valores de sustrato (Glucosa) residual fueron calculados según la metodología que se presenta en el anexo 1 y los valores de biomasa producida fueron calculados según las metodología que se presenta en el anexo 2.

Al analizar los datos de biomasa y sustrato de la figura 4.7 se obtuvieron los parámetros de velocidad específica de crecimiento que se presentan en la figura 4.8.

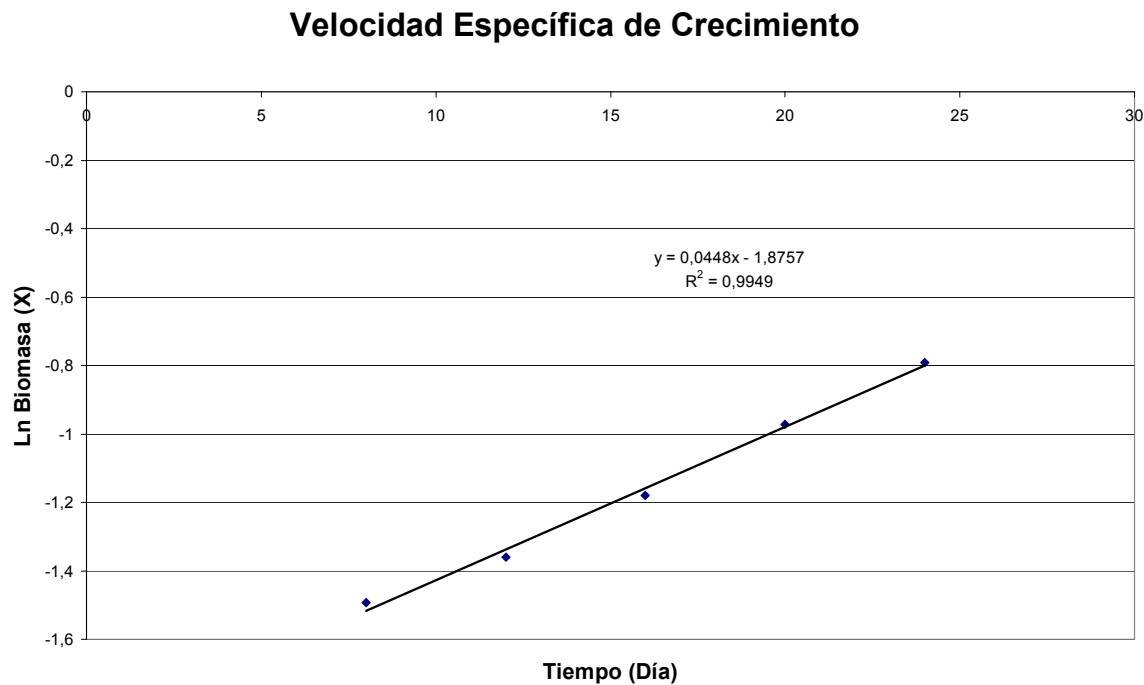


Figura 4.8: Velocidad específica de crecimiento de *Suillus luteus* en reactor agitado.

La velocidad específica de crecimiento ( $\mu_x$ ), se obtiene al analizar los datos de biomasa producida en logaritmo natural, al aplicar una regresión lineal a los datos de crecimiento exponencial graficados en relación al tiempo de cultivo, por lo que el valor obtenido de la velocidad específica de crecimiento es de  $0,0448 \text{ día}^{-1}$ .

### Rendimiento de Sustrato en Biomasa

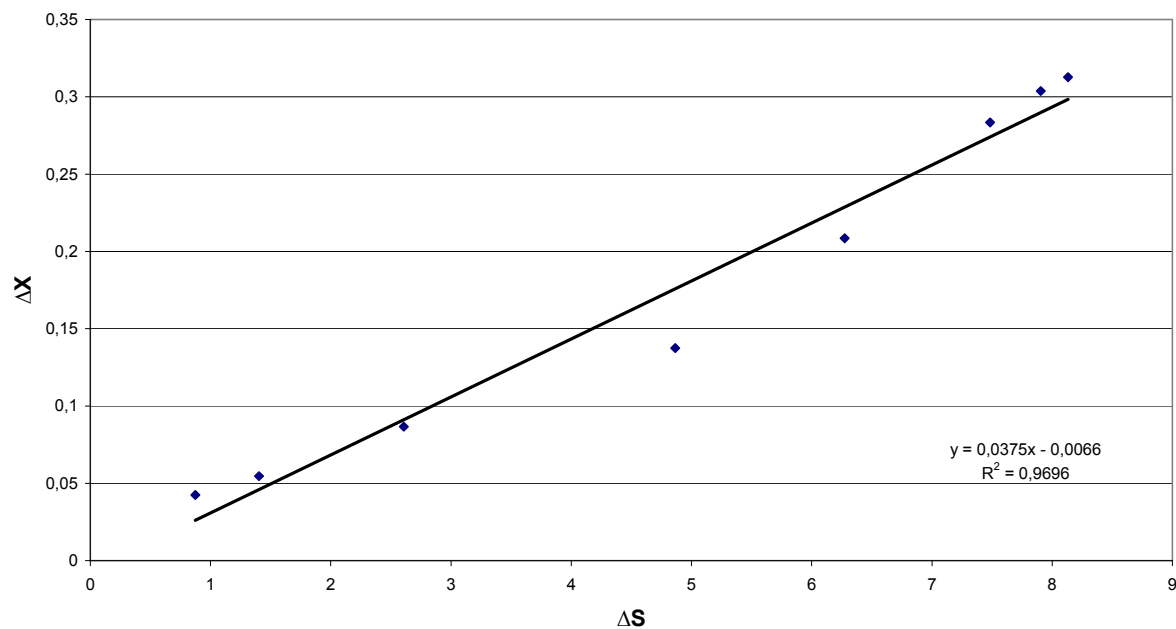


Figura 4.9: Rendimiento de sustrato en biomasa de *Suillus luteus* en reactor agitado.

La figura 4.9 muestra la representación gráfica del rendimiento de sustrato en biomasa de la cinética de crecimiento, cuyo valor del rendimiento de sustrato en biomasa ( $Y_{X/S}$ ) es de 0,038. Valor calculado según la ecuación 3.2.

Tabla 4.3: Parámetros de crecimiento de *Suillus luteus* en reactor agitado.

Velocidad específica de crecimiento ( $\mu_x$ )	Rendimiento de sustrato en biomasa ( $Y_{X/S}$ )	Tiempo de duplicación ( $T_{dup}$ )	Productividad total de biomasa ( $Q_{X\ TOT}$ )	Productividad máxima de biomasa ( $Q_{X\ MAX}$ )
0,0448 día <sup>-1</sup>	0,038	15,47 día	0,0098 g/L día	0,019 g/L día

En la tabla 4.2 se presenta un resumen de los parámetros de crecimiento de *Suillus luteus* en reactor agitado: Velocidad específica de crecimiento ( $\mu_x$ ),

Rendimiento de sustrato en biomasa ( $Y_{X/S}$ ), Tiempo de duplicación ( $T_{dup}$ ), Productividad total de biomasa ( $Q_{X\ TOT}$ ) y Productividad máxima de biomasa ( $Q_{X\ MAX}$ ). En el anexo 3 se presenta la forma de cálculo de cada uno de estos valores.

## CAPITULO 5

### DISCUSIÓN

#### 5.1 Determinación de temperatura de cultivo en frascos

Los datos presentados en las figuras 4.1, 4.2 y 4.3, muestran la dependencia del crecimiento con respecto a las temperaturas analizadas (10°C, 23°C y 30°C). La diferencia a pesar de ser baja, benefició el crecimiento de micelio a 23°C, cuyo resultado es concordante con el trabajo realizado por otros autores quienes utilizaron temperaturas de trabajo que oscilan entre los 20 y 25 °C.

En los estudios realizados por Rossi (2006) utilizó una temperatura de trabajo de  $25\pm 1$  °C, en cambio Sasek y Musílek (1971) utilizaron una temperatura de trabajo de 20°C. Por otro lado, Sasek (1989) utilizó una temperatura de trabajo de 24°C; Senior *et al* (1993) utiliza una temperatura de trabajo de 25°C; Carrillo *et al* (2004) utiliza una temperatura de trabajo de 23°C y Kuek (1995) utiliza una temperatura de trabajo de 25°C. El resultado de estas investigaciones fue similar entre ellas, se encontraron cinéticas de crecimiento cercanas a los 15 días de cultivo, donde se aprovechó el sustrato limitante casi completamente y se obtuvieron valores de productividad altos.

Los datos presentados en las figuras 4.1, 4.2 y 4.3, presentan altos niveles de dispersión para cada punto analizado, debido a dos razones fundamentales, por una parte, el método de muestreo destructivo habitualmente presenta una alta dispersión, ya que la cinética no se representa en base a un mismo cultivo, sino a muchos cultivos distintos por lo que puede presentar dispersiones como las que se ven en las figuras antes mencionadas. Es obligatoria la utilización de este tipo de muestreo en volúmenes bajos de cultivo líquido, ya que el micelio en interacción con el agua presenta un crecimiento en forma discreta (pellets), lo que implica que el cultivo es heterogéneo desde la perspectiva física y fisiológica (Acevedo, 2002).

Por otra parte, se trabajó inoculando trozos de micelio-agar como inóculos iniciales, estos fueron cuantificados en relación a su crecimiento radial, pero también presentan un crecimiento en la dimensión vertical importante por la morfología del micelio. Este crecimiento podría afectar más a la biomasa inicial al momento de comenzar los ensayos, lo que finalmente podría influir en la cantidad de biomasa producida en la fermentación. A pesar de esto, los resultados concuerdan con los experimentos efectuados en los estudios mencionados anteriormente.

## **5.2. Determinación de los parámetros de crecimiento en frascos**

La cinética realizada en frascos, ilustrada en la figura 4.4, presenta un modelo de crecimiento similar al de los microorganismos, indicando al menos dos de las fases características de este tipo de cultivos: fase exponencial, desde el momento inicial de cultivo hasta el día 12; y fase estacionaria, desde el día 13 hasta el día 24. Esto significa que en la fermentación se están dando las siguientes condiciones: el cultivo es por lotes, todas las células que componen la población se reproducen a intervalos regulares, no existiendo sustancias inhibitorias del crecimiento; y que efectivamente la composición del medio de cultivo es simple, especialmente en cuanto a las fuentes de carbono y nitrógeno.

Estos resultados fueron los esperados en relación a los hallazgos de Rossi (2006), quien alcanza la fase estacionaria de crecimiento entre los 12 y los 16 días de cultivo, a pesar de no consumirse toda la glucosa presentada en el medio de cultivo, propósito deseable en fermentaciones con medios de cultivos definidos y en condiciones de cultivo ideales, para alcanzar una cinética completa (Rossi, 2006). Esto puede deberse a la formulación del medio de cultivo utilizado, diseñado específicamente para la composición de biomasa y crecimiento de alguna otra especie fúngica o la falta de especificidad en la constitución del medio de cultivo, preparado de forma estándar para el crecimiento de muchas especies de hongos.

Al analizar la composición elemental de un hongo cualquiera, se pueden calcular los requerimientos nutricionales para el crecimiento del mismo, de esta forma se analizó la composición elemental que se entrega en la tabla 5.1, a partir de ésta se calcularon los requerimientos nutricionales en base a un exceso de 50% en los sustratos no limitantes y una biomasa máxima de 7 g/L. Al comparar la formulación calculada con la de los medios de cultivo utilizados en la investigación, se observa una deficiencia de nitrógeno en los medios de cultivo, por lo que el sustrato limitante no es necesariamente la fuente de carbono, si se considera la composición elemental estándar para hongos de Stanbury (2003). Es probablemente por esto que la glucosa no se consumió completamente en las fermentaciones y quizás también porque la fermentación no produjo mayor cantidad de biomasa (tabla 5.2). La cantidad de nitrógeno entregada en los medios de 0,75 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  para el medio MMN y de 2 g/L de peptona para el medio BAF, razón por la cual podría explicarse que no se haya consumido completamente la glucosa de los medios de cultivo. Es por esto que el nitrógeno podría haberse convertido en el sustrato limitante de los medios de cultivo utilizados.

Tabla 5.1: Composición elemental de biomasa en hongos.

Elemento	Hongos
Carbono	51,5%
Nitrógeno	8,5%
Fósforo	0,425%
Sulfuro	0,3%
Potasio	1,35%
Sodio	0,26%
Calcio	0,75%
Magnesio	0,3%
Hierro	0,15%

(Stanbury P. F., A. Whitaker, S. J. Hall. 2003)

Tabla 5.2: Requerimientos nutricionales según la composición de biomasa de un hongo.

Elemento	Fuente	PM	%Ei	%Ec	f	Y x/s	S (g/L)
C	Glucosa	180,16	39,96	51,5	0,6	0,47	15,03
N	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	132	21,21	8,5	1	2,50	4,21
K	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136	28,68	1,35	1	21,24	0,49
Na	NaCl	58	39,66	0,26	1	152,52	0,07
Ca	CaCl <sub>2</sub>	106	37,74	0,75	1	50,31	0,20
Mg	MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	246,3	9,74	0,3	1	32,48	0,32
Fe	FeCl <sub>3</sub>	159,19	35,18	0,15	1	234,52	0,04

Los datos entregados por la cinética de la figura 4.4, muestran un proceso de crecimiento muy lento, donde se consume una gran cantidad de glucosa para producir biomasa, esto se deduce también de los datos entregados en la tabla 4.1.

El rendimiento de sustrato en biomasa representa una relación de la variación de la biomasa y del consumo de sustrato como se aprecia en la figura 4.6. En comparación al valor encontrado en esta experimentación (0,23 g/g aproximadamente), y que correspondería a la mitad de lo comúnmente presentado por bacterias de 0,42 g/g (Acevedo, 2002). Estos resultados fueron menores a los esperados en vista de los hallazgos de Rossi (2006), quien obtuvo el doble de rendimiento aproximadamente, entre 0,40 g/g y 0,44 g/g con otras especies de hongos ectomicorrícicos.

La productividad volumétrica de biomasa total y máxima, representa una manifestación del rendimiento considerando el aspecto cinético de la fermentación, en comparación con los parámetros observados para bacterias (Acevedo, 2002), que son aproximadamente la mitad de los encontrados en esta experimentación de 0,083 g/L día para la productividad total de biomasa ( $Q_{X\text{ TOT}}$ ) y de 0,132 g/L día para la productividad máxima de biomasa ( $Q_{X\text{ MAX}}$ ). Estos resultados fueron menores a los esperados según lo observado por Rossi (2006), quien obtuvo 0,42 g/L día en

promedio, lo que significa el triple de productividad aproximadamente en otras especies de hongos ectomicorrícicos.

La velocidad específica de crecimiento encontrada fue de  $0,074 \text{ día}^{-1}$ , como se aprecia en la tabla 4.1. En bacterias, la velocidad específica de crecimiento fluctúa entre  $2,3 \text{ horas}^{-1}$  y  $2,7 \text{ horas}^{-1}$ , lo que equivale a valores entre 700 a 1000 veces mayores aproximadamente a lo encontrado. En hongos filamentosos, la velocidad específica de crecimiento fluctúa entre  $0,09 \text{ horas}^{-1}$  y  $0,45 \text{ horas}^{-1}$ , lo que equivale a valores entre 10 a 30 veces mayores aproximadamente a lo encontrado (Acevedo, 2002). Estos resultados fueron menores a los esperados según los hallazgos de Rossi (2006), quien obtuvo el triple de velocidad específica de crecimiento aproximadamente, con valores entre  $0,17 \text{ día}^{-1}$  y  $0,28 \text{ día}^{-1}$  en otras especies de hongos ectomicorrícicos.

El tiempo de duplicación es el tiempo que media entre dos duplicaciones sucesivas, obteniéndose en la experimentación realizada un tiempo de duplicación de 9,321 días. En bacterias, este valor fluctúa entre 0,3 horas y 2,5 horas, lo que equivale a valores entre 700 a 1000 veces menores aproximadamente a lo encontrado. En hongos filamentosos, el tiempo de duplicación fluctúa entre 1,5 horas y 7,0 horas, lo que equivale a valores aproximados de entre 10 a 30 veces menores a lo encontrado (Acevedo, 2002). Estos resultados fueron mayores a los esperados según los hallazgos de Rossi (2006), quien obtuvo la tercera parte de tiempo de duplicación aproximadamente, con valores de entre 2,5 días y 4,1 días en otras especies de hongos ectomicorrícicos.

El pH muestra una disminución en la zona de crecimiento exponencial, que se sostuvo en la zona de crecimiento estacionario. Estos hallazgos eran esperables, en vista de los encontrados por Rossi (2006), el que encontró en sus experimentaciones una disminución de pH de 5,8 a 3,0 en promedio, esta variación de pH podría deberse a la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo MMN, en este se utiliza el  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , el cual al descomponerse libera tres protones por cada molécula de

$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  los cuales quedan libres en el medio, acidificando la fermentación. Por otra parte no se justifica trabajar con condiciones de pH más bajas, pues se demostró en investigaciones anteriores en medio semisólido, que el pH con mayor tasa de crecimiento para estos medios de cultivo es de 5.8.

La cinética de producción de proteína no fue lo que se esperaba y no obedeció a un comportamiento similar al de producción de biomasa, produciendo una cantidad insuficiente para ser considerado como un producto válido para el cálculo de parámetros de crecimiento. Sin embargo, resultados diferentes obtenidos por Musilek *et al.* (1969), permitió cuantificar proteínas y antibióticos como productos de la fermentación de hongos ectomicorrícicos. Esto debido a que el hongo no produjo proteína extracelular como producto directo de la fermentación, y del crecimiento de biomasa del hongo, como sucede comúnmente en las fermentaciones de bacterias. Esto es esperable en hongos lisótrofos, los que secretan sustancias proteicas al exterior para degradar polímeros útiles para su nutrición, esto probablemente debido a que no existe el estímulo en el medio de cultivo de la presencia de macromoléculas que necesitan ser degradadas, pues el sustrato se entrega de forma simple para la rapidez de la fermentación. Debido a estos resultados, no se consideraron los resultados de proteína residual para propósitos de cálculo de parámetros, aunque de todos modos la observación revela que no hay producción de proteína extracelular lo que es biológicamente un hecho interesante. Por otra parte, es probable que existan otros productos extracelulares de carácter no proteico o que no son cuantificables con la metodología de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) de cuantificación de proteínas y que son útiles para calcular los parámetros asociados a los productos que podrían ser investigados.

### **5.3. Determinación de los parámetros de crecimiento en reactor agitado**

La cinética realizada en el reactor agitado (ilustrada en la figura 4.7), indica al menos dos fases, al igual que la cinética realizada en frascos. Se observa una fase exponencial desde el octavo día de cultivo hasta el día 24 y una fase estacionaria

desde el día 25 hasta el día 32 del cultivo. Es por esto que el cultivo en reactor agitado, al igual que el cultivo realizado en frascos, se encuentra bajo las siguientes condiciones: el cultivo es por lotes, todas las células que componen la población se reproducen en intervalos regulares, no existiendo sustancias inhibitorias del crecimiento; y la composición del medio de cultivo es simple (Acevedo, 2002).

Los resultados presentados en la figura 4.7, para la cinética de crecimiento en reactor agitado, demuestran un crecimiento muy lento, además no presenta mejoras notorias con respecto a la cinética realizada en frascos. Esto puede deberse a la falta de optimización de las condiciones consideradas para el hongo, las cuales le permiten al hongo crecer de forma más rápida y óptima, o que la cantidad de inóculo inicial considerada pudo haber sido baja. A partir del trabajo de Rossi (2006) se conoce que la cantidad de inóculo inicial en el cultivo en reactor es muy importante para la fermentación de hongos y una cantidad baja podría haber influido en los bajos valores de productividad (tabla 4.2). Por otra parte, existieron diferencias en la composición de los medios de cultivo, ya que, no se consumió toda la glucosa presente en estos, propósito deseable en fermentaciones con medios definidos y en condiciones de cultivo ideales (Rossi, 2006). Esto puede deberse a la formulación del medio de cultivo utilizado, diseñado de forma estándar para el crecimiento de muchas especies de hongos y en el cual probablemente no se utilizó el criterio del balance de masa como guía para su formulación.

La fermentación realizada en reactor agitado se llevó a cabo con la utilización del medio de cultivo BAF líquido con 15 g de glucosa. Cabe destacar que la utilización del medio MMN líquido, empleado en las fermentaciones en frascos, se produjo a causa de la cuantificación de proteína, ya que este medio no contiene interferentes con la metodología de Lowry. En vista de que las experimentaciones realizadas en frascos con la metodología de Lowry probaron que no se produce proteína como un producto de la fermentación de este hongo y que ésta no sirve para caracterizarlo cinéticamente; es por esto que se decidió no cuantificar la

proteína en la cinética realizada en reactor agitado. El medio de cultivo BAF aporta 2 g/L de peptona como fuente de nitrógeno (tabla 3.1), la tabla 5.2 de requerimientos nutricionales mínimos, indica que es necesario contar con al menos 4,21 g/L de fuente de nitrógeno, por lo que podría existir una deficiencia de nitrógeno.

El rendimiento de sustrato en biomasa se aprecia en la figura 4.9. En comparación al valor encontrado en esta experimentación (0,038 aproximadamente), que correspondería a la décima parte de lo comúnmente presentado por bacterias de 0,42 g/g (Acevedo, 2002). Estos resultados fueron menores a los esperados en vista de los resultados de Rossi (2006), quien obtuvo diez veces más rendimiento (aproximadamente, entre 0,40 g/g y 0,44 g/g) con otras especies de hongos ectomicorrícicos. Al comparar este resultado con el encontrado en la cinética realizada en frascos de 0,23, encontramos que el rendimiento baja considerablemente. Esto puede deberse a las condiciones no optimizadas del cultivo en reactor y a la baja cantidad de inóculo inicial considerada en el cultivo en reactor (tabla 4.1 y tabla 4.2).

La productividad volumétrica de biomasa total y máxima, en comparación a los resultados observados para la cinética realizada en frascos, equivalen aproximadamente a la décima parte de los encontrados en esta experimentación de 0,0098 g/L día, para la productividad total de biomasa ( $Q_{X\text{ TOT}}$ ) y de 0,019 g/L día para la productividad máxima de biomasa ( $Q_{X\text{ MAX}}$ ). Estos resultados fueron menores a los esperados según lo obtenido por Rossi (2006), con 0,42 g/L día en promedio, lo que significa entre 20 a 40 veces más productividad aproximadamente al utilizar otras especies de hongos ectomicorrícicos. Estos resultados pueden deberse a las condiciones no optimizadas del cultivo en reactor y a la baja cantidad de inóculo inicial considerada en el cultivo en reactor (tabla 4.1 y tabla 4.2).

La velocidad específica de crecimiento encontrada fue de  $0,0448\text{ día}^{-1}$ , como se aprecia en la tabla 4.2. En bacterias, la velocidad específica de crecimiento fluctúa entre  $2,3\text{ horas}^{-1}$  y  $2,7\text{ horas}^{-1}$ , lo que equivale a valores entre 1000 a 1500 veces

mayores aproximadamente a lo encontrado. En hongos filamentosos, la velocidad específica de crecimiento fluctúa entre  $0,09 \text{ horas}^{-1}$  y  $0,45 \text{ horas}^{-1}$ , lo que equivale a valores entre 15 a 50 veces mayores aproximadamente a lo encontrado (Acevedo, 2002). Estos resultados fueron menores a los esperados según lo encontrado por Rossi (2006), quien obtuvo el quíntuple de velocidad específica de crecimiento aproximadamente, con valores entre  $0,17 \text{ día}^{-1}$  y  $0,28 \text{ día}^{-1}$  en otras especies de hongos ectomicorrícicos. Al comparar este resultado con el encontrado en la cinética realizada en frascos de  $0,074 \text{ día}^{-1}$ , encontramos que la velocidad específica de crecimiento baja considerablemente, esto puede deberse a las condiciones no optimizadas del cultivo en reactor y a la baja cantidad de inóculo inicial considerada en el cultivo en reactor (tabla 4.1 y tabla 4.2).

El tiempo de duplicación obtenido en esta experimentación fue de 15,47 días. En bacterias, este valor fluctúa entre 0,3 horas y 2,5 horas, lo que equivale a valores entre 1000 a 1500 veces menores aproximadamente a lo encontrado. En hongos filamentosos, el tiempo de duplicación fluctúa entre 1,5 horas y 7,0 horas, lo que equivale a valores entre 15 a 50 veces menores aproximadamente a lo encontrado (Acevedo, 2002). Estos resultados fueron mayores a los alcanzados por Rossi (2006), quien obtuvo la quinta parte de tiempo de duplicación aproximadamente, con valores de entre 2,5 días y 4,1 días en otras especies de hongos ectomicorrícicos. Al comparar este resultado con el encontrado en la cinética realizada en frascos de 9,321 día, se encontró que el tiempo de duplicación baja considerablemente, esto puede deberse a las condiciones no optimizadas del cultivo en reactor y a la baja cantidad de inóculo inicial considerada en el cultivo en reactor (tabla 4.1 y tabla 4.2).

El pH se mantuvo constante a lo largo de toda la fermentación, a través de la adición controlada de ácido clorhídrico e hidróxido de potasio y el monitoreo de un sensor de pH presente en el reactor.

Las diferencias existentes entre los resultados presentados por Rossi (2006) y la presente investigación pueden atribuirse a las distintas condiciones de ambos

estudios. Si comparamos la metodología utilizada, se advierte que Rossi (2006), utiliza medios de cultivo que no superan los 14 g/L de glucosa argumentando que no deben utilizarse medios de cultivo que superen los 16 g/L de glucosa. También indica que la relación de carbono y nitrógeno debe ser superior a 14, por lo que los medios de cultivo deben ser ajustados para cumplir este requisito. Así mismo, utiliza medios de cultivo enriquecidos con micronutrientes no considerados en la presente investigación. Este contempla un gran contraste con respecto a la investigación aquí realizada, y puede vislumbrar gran parte de las diferencias en los resultados.

Por otra parte Rossi (2006) señala que la concentración inicial de biomasa debe superar los 0,5 g/L, para obtener altas productividades y rendimientos. También señala que el inóculo inicial debe ser homogenizado, por ejemplo en una licuadora a 3600 rpm, durante 20 segundos, condiciones utilizadas en su investigación. Esta diferencia es radical desde el punto de vista de la naturaleza del inóculo inicial y del crecimiento que el hongo puede efectuar en la fermentación.

La diferencia fundamental entre las experiencias realizadas en ambas investigaciones radica en la naturaleza de los reactores utilizados. El equipo utilizado por Rossi (2006) es un Airlift y el utilizado en esta investigación es un reactor agitado. Ambos son útiles en fermentaciones a nivel de laboratorio, ambos logran mezclar satisfactoriamente los nutrientes y repartirlos homogéneamente dentro del reactor, la diferencia de estos radica en el estrés que el agitador genera dentro del cultivo en el reactor agitado. Estas fuerzas, presentes a causa de la agitación, se encuentran minimizadas en el cultivo con el reactor Airlift, por lo que esto podría representar la mejora en la fermentación con este instrumento (Stanbury, 2003).

Si considera la parte biológica del cultivo de Rossi (2006), se diferencian de la presente investigación por las especies utilizadas en las experiencias, siendo *Scleroderma sp.* (Persoon) Fries; *Rhizopogon nigrescens* (Coker & Couch); *Rhizopogon vulgaris* (Vitt.) M. Lange; *Pisolithus microcarpus* (Cooke & Masee) G. Cunn; *Chondrogaster angustisporus* (Giachini, Castellano, Trappe & Oliveira) y

*Pisolithus microcarpus* (Cooke & Masee) G. Cunn utilizadas por Rossi (2006), en cambio tan sólo fue utilizado *S. luteus* en esta investigación. De esta forma, distintos hongos poseen características cinéticas de crecimiento que los diferencian, por lo que el uso de distintos hongos implica grandes cambios en la naturaleza de los resultados encontrados.

## CAPITULO 6

### CONCLUSIONES

La temperatura de trabajo más adecuada es de 23°C, ya que presenta los resultados con mayor crecimiento de biomasa y consumo de sustrato, es decir, la cinética de crecimiento es más veloz.

La cuantificación de biomasa por el método del peso seco resultó ser una técnica satisfactoria para la medición del crecimiento del hongo en el cultivo sumergido y para la cuantificación de la cinética de cultivo.

Los parámetros calculados a partir de la cinética realizada en frascos, son representativos del crecimiento de este tipo de organismos. Estos entregan información útil para caracterizar el crecimiento de *Suillus luteus* en frascos y muestran un crecimiento con una baja tasa de rendimiento de sustrato en biomasa.

No hay producción de proteína extracelular, por lo que la cuantificación de proteína no resultó ser un parámetro representativo de la cinética de obtención de producto, por esto no puede ser utilizada para caracterizar a *Suillus luteus*.

La cinética de crecimiento realizada en el reactor agitado muestra un comportamiento similar al de los microorganismos cuando se fermentan en reactor, aunque mucho más lenta. La fermentación realizada en el reactor entrego parámetros más lentos que la fermentación en frascos, por lo tanto la cinética del reactor fue más lenta que la realizada en frascos.

## **CAPITULO 7**

### **RECOMENDACIONES**

Para lograr resultados más útiles, se recomienda ampliar las variables a investigar incluyendo algunas tales como agitación, aireación, pH, etc.

Es necesario realizar estudios detallados sobre la naturaleza del inóculo inicial donde se contemplen variables como cantidad de inóculo inicial, tamaño del inóculo inicial, etc.

También es recomendable formular un medio de cultivo específico para el hongo a cultivar, donde la glucosa sea el nutriente limitante con seguridad y no existan deficiencias nutricionales de otros sustratos.

Es recomendable realizar investigaciones a fondo sobre la temperatura de trabajo, que sustenten diferencias significativas en la producción de biomasa y en la disminución de sustrato.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Absolute Astronomy. Hypha. Consultado 23/07/2009. Disponible en: <http://www.absoluteastronomy.com/topics/Hypha>.
2. Acevedo F., J.C. Gentina, A. Illanes. 2002. **Fundamentos de Ingeniería Bioquímica**. 1º edición. 347pp. Ediciones Universitarias de Valparaíso de la Universidad Católica de Valparaíso. Valparaíso, Chile.
3. Asociación Micologica de Durango. *Suillus luteus*. Consultado 23/07/2009. Disponible en: <http://www.errotari.com/Micologia/especie.php?1254>.
4. Australian National Herbarium. Mycorrhizas. Consultado 23/07/2009. Disponible en: <http://www.anbg.gov.au/fungi/mycorrhiza.html>.
5. Biotron Inc. LiFlus GM\_Fermenter. Consultado 23/07/2009. Disponible en: <http://biotron.en.ecplaza.net/catalog.asp?DirectoryID=95712&CatalogID=297636>.
6. Carrillo, C.; Díaz, G.; Honorubia, M. 2004. Improving the production of ectomycorrhizal mycelium in a bioreactor by measuring the ergosterol content. **Engineering Life Sciences**. Vol N° 4(1): 43-45.
7. Centro Tecnológico de la Planta Forestal (CTPF). Selección de Inóculos Biológicos y Desarrollo de Tecnologías para su Aplicación en Viveros

- Forestales. Consultado 23/07/2009. Disponible en: [http://www.ctpf.cl/index2.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&gid=65&Itemid=33](http://www.ctpf.cl/index2.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=65&Itemid=33).
8. Chung G, P. 2005. Hongos Micorrízicos Comestibles en Plantaciones Forestales. Instituto Forestal de Chile (INFOR). Diapositivas. 48-55 pp.
  9. Demain A., Davies, J. 1999. **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 2ª edición. 829 pp. ASM Press. Washington, D.C., EEUU.
  10. Empresas CMPC. El árbol el pino insigne (*Pinus radiata D.Don*). Consultado 23/07/2009. Disponible en: [http://www.papelnet.cl/arbol/pino\\_insigne.htm](http://www.papelnet.cl/arbol/pino_insigne.htm).
  11. Encyclopedia of Life. 2009. *Suillus luteus*. Consultado 27/10/2009. Disponible en: <http://www.eol.org/pages/133591>.
  12. Hemard C, C Ilabaca, G Jerez, P Sandoval, A Ulloa. 2008. Universidad de Chile. Aspectos generales de las micorrizas. Consultado 27/10/2009. Fotografía modificada de: <http://www.forestaluchile.cl/cursos/fivegf/mico.htm>.
  13. HUMAN GMBH. Glucosa liquicolor. Consultado 23/07/2009. Disponible en: [www.bganalizadores.com.ar/insertos\\_productos/inserto60.pdf](http://www.bganalizadores.com.ar/insertos_productos/inserto60.pdf).

14. Izco, J.; Barreno, E.; Bruguçes, M.; Costa, M.; Devesa, J.A.; Fernández, F.; Gallardo, T.; Llimona, X.; Prada, C.; Talavera, S.; Valdés, B. 2004. **Botánica**. 2ª edición. 906 pp. McGraw-Hill – Interamericana de España, S. A. U., Madrid, España.
15. Kuek, C. 1995. Shake flask culture of *Laccaria laccata*, an ectomycorrhizal basidiomycete. **Appl Microbiol Biotechnol**. Vol N°45: 319-326.
16. Kuo, M. 2004. *Suillus luteus*: The slippery jack. Fotografía disponible en: [http://www.mushroomexpert.com/suillus\\_luteus.html](http://www.mushroomexpert.com/suillus_luteus.html).
17. Landis T.D., R.W. Tinus, S.E. McDonald, J.P. Barnett. 1989. Seedling Nutrition and Irrigation, **The Container Tree Nursery Manual. Agric. Handbk**. Vol. N°4 (674). 119pp.
18. LIGNUM. Recurso forestal y producción en Chile. Consultado 23/07/2009. Disponible en: [http://www.difel.cl/contenido/pdf/sector\\_cifras\\_2.pdf](http://www.difel.cl/contenido/pdf/sector_cifras_2.pdf).
19. Lowry O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr y R.J. Randall. 1951. Lowry's Method. **The Journal of Biological Chemistry**. Vol N° 193: 265-275.
20. Musilek V., J. Cerna, V. Sasek, M. Semerdzieva, M. Vondracek. Antifungal antibiotic of the basidiomycete *Oudemansiella mucida*. **Folia microbiológica**. Vol N°14: 377-387.

21. Northern Ireland fungus group (NIFG). Ectomycorrhizal fungi. Consultado 23/07/2009. Disponible en: <http://www.nifg.org.uk/ecto.htm>.
22. Pearsons Benjamin Cummings. 2005. Desarrollo evolutivo de los hongos. Consultado 27/10/2009. Fotografía modificada de <http://www.micomania.rizoazul.com/micologia%20el%20reino%20fungi.html>.
23. Pearsons Benjamin Cummings. 2002. Desarrollo evolutivo de los hongos. Consultado 27/10/2009. Fotografía modificada de <http://www.micomania.rizoazul.com/micologia%20el%20reino%20fungi.html>.
24. Rossi, M.J. 2006. Tecnología para producción de inoculantes de hongos ectomicorrícicos utilizando cultivo sumergido en biorreactor *Airlift*. Tesis de doctorado en Ingeniería Química. Florianópolis, Brasil. Universidad Federal de Santa Catarina, Facultad de Química.
25. Raven P., R. Evert, S. Eichhorn. 1999. **Biology of Plants**. 6ª edición. 944 pp. W.H. Freeman And Company Worth Publishers.
26. Red naturaleza. Setas. BOLETUS (SUILLUS) LUTEUS. Consultado 23/07/2009. Disponible en: [http://www.rednaturaleza.com/Boletus-\(Suillus\)-luteus-dts2094.htm](http://www.rednaturaleza.com/Boletus-(Suillus)-luteus-dts2094.htm).

27. Sánchez, F.; Honorubia, M.; Torres, P. 2000. Características culturales de algunos hongos ectomicorrícicos en cultivo puro. **Revista Iberoamericana Micología**, vol. Nº17: 127-134.
28. Santiago-Martínez G, A Estrada-Torres, L Varela y T Herrera. 2003. Crecimiento en siete medios nutritivos y síntesis in vitro de una cepa de *laccaria bicolor*. **Agrociencia**. Vol. Nº 37(6). 575-584 pp.
29. Sasek, V.; Musílek, V. 1971. Growth promotion of slowly mycorrhizal basidiomycetes in submerged culture. **Proceedings of the first North American conference on Mycorrhizae**. Misc. Publ. 1189, 216-218. USDA Forest Service, Washington, EEUU.
30. Sasek, V. 1989. Submerged cultivation of ectomycorrhizal fungi. **Agriculture, Ecosystems and Environment**. vol. Nº 28: 441-447.
31. Senior, E., J.E. Smith, I.A. Watson-Craik, J.E. Tosh. 1993. Ectomycorrhizae and landfill site reclamations: fungal selection criteria. **Applied Microbiology**. Vol. Nº16: 142-146.
32. Sitte P., E.W. Weiller, J.W. Kadereit, A. Bresinsky, C. Körner. 2002. **Tratado de Botanica**. 35ª edición. 1134 pp. Ediciones Omega. Barcelona, España.

33. Stanbury P. F., A. Whitaker, S. J. Hall. 2003. **Principles of Fermentation Technology**. 2ª edición. 357 pp. Butterworth Heinemann. Oxford.
34. Unité de Recherche Génomique Info (URGI). *Hebeloma cylindrosporum*. A model fungus for molecular analysis of ectomycorrhizal symbiosis. Consultado 23/07/2009. Disponible en: [http://urgi.versailles.inra.fr/projects/INRA\\_Hcy1/index.php](http://urgi.versailles.inra.fr/projects/INRA_Hcy1/index.php).
35. Universidad de Coimbra. 2009. Tipos de micorrizas. Consultado 27/10/2009. Fotografía disponible en: [http://www.dei.uc.pt/grasses/Divers\\_fungica/tipos\\_de\\_micorrizas](http://www.dei.uc.pt/grasses/Divers_fungica/tipos_de_micorrizas).
36. Vignoli, R. 2006. **Temas de bacteriología y virología medica**. 2ª Edición. pp. 609-629. Editorial Medica Panamericana, Paraguay.

## Anexo 1

### Determinación de sustrato

#### Kit de detección de glucosa liquicolor de HUMAN

#### Curva de Calibrado Glucosa

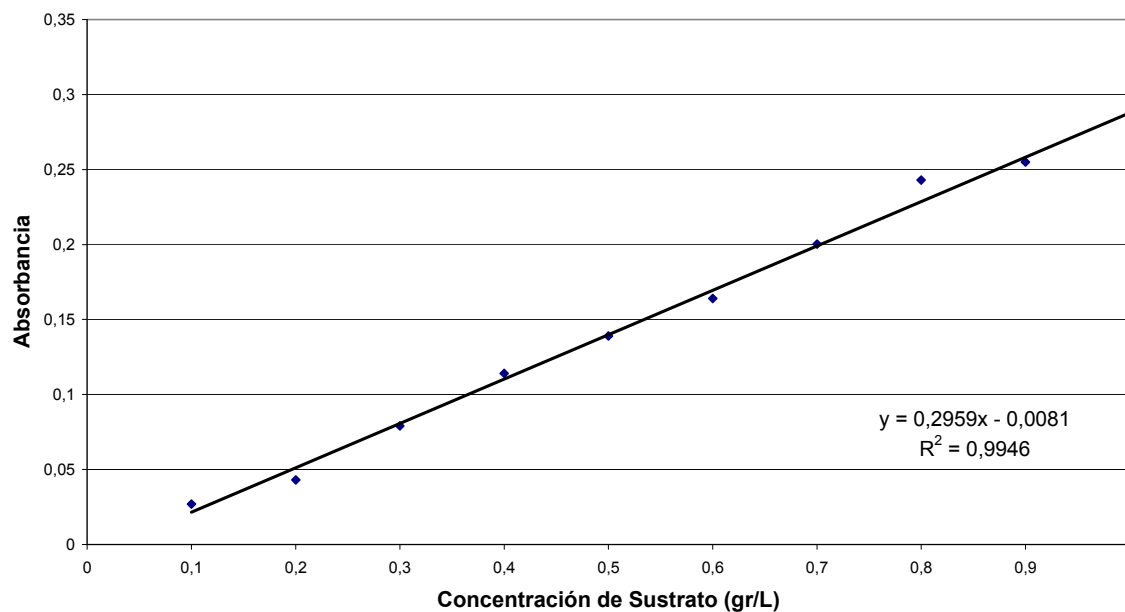


Figura A.1: "Curva de calibrado de glucosa"

$$A = mS + i$$

Pendiente (m) = 0,2959

Intercepto (i) = -0,0081

Ejemplo:

Muestra A, día 24, Cinética de determinación de parámetros

Absorbancia (A) = 0,180

Factor de Dilución (f) = 10

$$S = \left[ \frac{A - i}{m} \right] * f$$

$$S = \left[ \frac{0,18 + 0,0081}{0,2959} \right] * 10 = 6,36 \text{ g/L}$$

## Anexo 2

### Determinación de biomasa

#### Método del peso seco

$$X = \frac{(M_{a+f} - M_f)}{V_a}$$

Ejemplo:

Masa de la muestra seca + masa del papel filtro ( $M_{a+f}$ ) = 0,419 g

Masa del papel filtro ( $M_f$ ) = 0,261

Volumen de la muestra ( $V_a$ ) = 50 mL

$$X = \frac{(0,419 - 0,261)}{0,05} = 3,16 \text{ g/L}$$

## Anexo 3

### Determinación de parámetros de crecimiento

#### Velocidad específica de crecimiento

#### Regresión lineal

De la regresión lineal de la figura 4.5, se obtiene que la velocidad específica de crecimiento es  $0,074 \text{ día}^{-1}$ .

#### Rendimiento de Sustrato en biomasa

$$Y_{x/s} = \frac{(X - X_0)}{(S_0 - S)}$$

Ejemplo:

Rendimiento de sustrato en biomasa global

Concentración de biomasa del cultivo (X) = 3,10 g/L

Concentración de biomasa al inicio del cultivo ( $X_0$ ) = 1,11 g/L

Concentración de sustrato del cultivo (S) = 6,31 g/L

Concentración de sustrato al inicio del cultivo ( $S_0$ ) = 15,05 g/L

$$Y_{x/s} = \frac{(3,1 - 1,11)}{(15,05 - 6,31)} = 0,23$$

### Tiempo de Duplicación

$$t_{dup} = \frac{\ln 2}{\mu_M}$$

Ejemplo:

Velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu_M$ ) = 0,074 día<sup>-1</sup>

$$t_{dup} = \frac{\ln 2}{0,074} = 9,321 \text{ día}$$

### Productividad de biomasa

$$Q_x = \frac{(X_m - X_0)}{t_f}$$

Ejemplo:

Productividad de biomasa máxima

Concentración de biomasa ( $X_m$ ) = 2,7 g/L

Concentración de biomasa al inicio del cultivo ( $X_0$ ) = 1,11 g/L

Tiempo total de cultivo ( $t_f$ ) = 12 días

$$Q_x = \frac{(2,7 - 1,11)}{12} = 0,132 \text{ g/L día}$$

## Anexo 4

### Determinación de proteína

#### Método de Lowry

#### Curva de Calibrado de Proteína

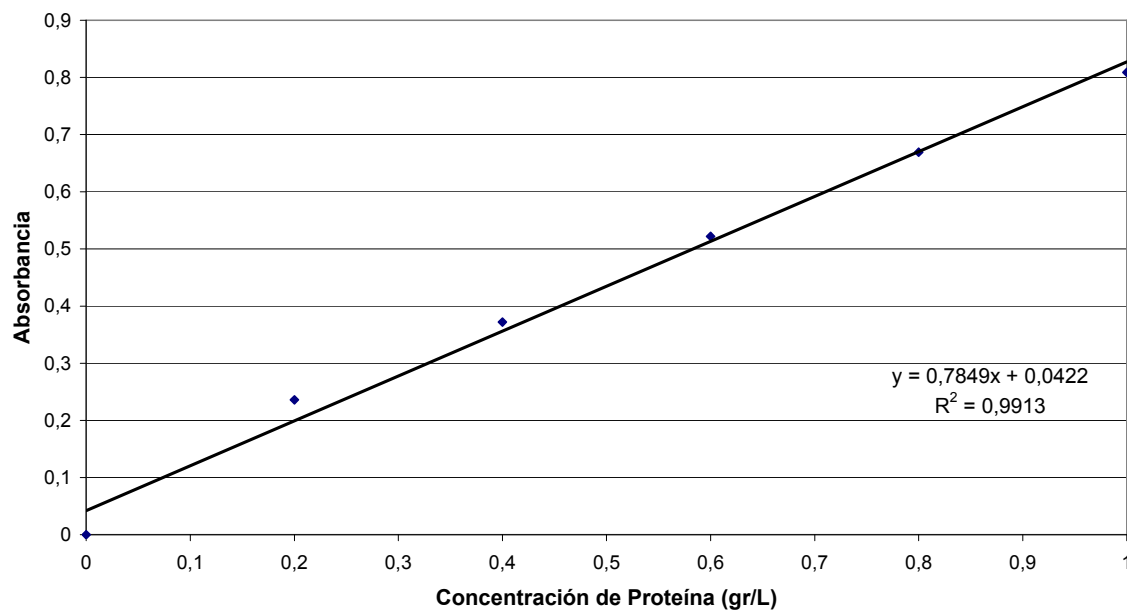


Figura A.2: Curva de calibrado de proteína

$$A = mP + i$$

Pendiente (m) = 0,7849

Intercepto (i) = 0,0422

Ejemplo:

Muestra A, día 24, Cinética de determinación de parámetros

Absorbancia (A) = 0,085

Factor de Dilución (f) = 1

$$P = \left[ \frac{A - i}{m} \right] * f$$

$$P = \left[ \frac{0,085 - 0,0422}{0,7849} \right] * 1 = 0,05 \text{ g/L}$$