

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



**“ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *Cyttaria espinosae* Lloyd OBTENIDOS EN
EL PREDIO RUCAMANQUE Y PROCESOS DE CONSERVACIÓN Y
PRESERVACIÓN”**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera, como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

ANA CECILIA ORTIZ SEPÚLVEDA

TEMUCO- CHILE

2013

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



**“ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *Cyttaria espinosae* Lloyd OBTENIDOS EN
EL PREDIO RUCAMANQUE Y PROCESOS DE CONSERVACIÓN Y
PRESERVACIÓN”**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera, como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

ANA CECILIA ORTIZ SEPÚLVEDA

PROFESOR GUÍA: DRA. MARIBEL EUGENIA PARADA IBÁÑEZ

TEMUCO- CHILE

2013

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *Cyttaria espinosae* Lloyd OBTENIDOS EN EL
PREDIO RUCAMANQUE Y PROCESOS DE CONSERVACIÓN Y
PRESERVACIÓN**

PROFESOR GUIA

: _____

Maribel Eugenia Parada Ibañez
Profesor en Biología y Cs. Naturales
Magíster en Cs. mención Protección Vegetal
Doctora por la Universidad de Sevilla
Departamento de Cs. Agronómicas y RRNN
Universidad de La Frontera

PROFESORES CONSEJEROS

: _____

Mauricio Alonso Reyes Schencke
Ingeniero Forestal
Departamento de Ciencias Forestales
Universidad de La Frontera

CALIFICACIÓN PROMEDIO TESIS

: _____

INDICE GENERAL

Capítulo	Contenido	Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRAFICA	4
2.1	Antecedentes generales sobre los hongos comestibles y sus propiedades funcionales y medicinales.	4
2.2	Valor Nutricional de los hongos Comestibles.	12
2.3	Actividad Antimicrobiana de hongos comestibles.	16
2.4	Hongos Comestibles en Chile.	17
2.5	Características generales de <i>Cyttaria espinosae</i> .	20
2.5.1	Mercado de <i>Cyttaria espinosae</i> .	22
2.6	Microorganismos asociados a hongos comestibles y condiciones de Conservación y Preservación.	23
2.6.1	Conservación y Preservación de Hongos Comestibles.	24
3	MATERIALES Y MÉTODOS.	27
3.1	Materiales e Infraestructura.	27
3.2	Metodología.	28
3.2.1	Aislamiento de <i>Pseudomonas fluorescens</i> y microorganismos asociados a <i>Cyttaria espinosae</i> . Técnica de recuento en placa.	28
3.2.2	Preparación de inóculos para ensayos de Inhibición.	28
3.2.3	Preparación de extractos de <i>Cyttaria espinosae</i> para su posterior utilización en antibiograma.	29
3.2.4	Antibiograma de los extractos naturales de <i>Cyttaria espinosae</i> a través del método de Kirby Bauer (Método de difusión en Agar) (Bauer <i>et al.</i> , 1966).	29

3.2.5	Tratamientos de conservación y preservación de <i>Cyttaria espinosae</i> .	31
3.2.6	Evaluación de las características organolépticas de los “digueños” sometidos a tratamientos de conservación y preservación.	32
3.2.7	Aislamiento de <i>Pseudomonas fluoerescens</i> y microorganismos asociados a los “digueños” sometidos a los tratamientos de conservación y preservación.	33
3.2.8	Identificación de <i>Pseudomonas fluorescens</i> y morfología y pureza de los microorganismos asociados a <i>Cyttaria espinosae</i> .	33
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	38
4.1	Aislamiento de <i>Pseudomonas fluorescens</i> y cepas bacterianas asociados a <i>Cyttaria espinosae</i> y su inhibición con extractos naturales.	38
4.1.1	Características organolépticas de los “digueños” en conservas y preservados, tratados con y sin antimicrobiano.	41
4.2	Actividad antimicrobiana de extractos frescos de <i>Cyttaria espinosae</i> frente a las bacterias fitopatógenas <i>Erwinia caratovora</i> y <i>Pseudomonas syrinage</i> .	45
4.3	Actividad antimicrobiana de extractos frescos de <i>Cyttaria espinosae</i> frente a los hongos fitopatógenos <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Fusarium</i> sp.	49
4.4	Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de “digueño” sometidos a los procesos de conservación y preservación.	54
5	CONCLUSIONES.	57
6	RESÚMEN.	58
7	SUMMARY.	59
8	LITERATURA CITADA.	60

INDICE DE CUADROS

Número	Título	Página
1	Número de especies de hongos silvestres comestibles y medicinales a nivel mundial (Boa, 2005).	7
2	Contenido Nutricional de <i>Pleurotus ostreatus</i> .	13
3	Contenido Nutricional de los hongos comestibles más utilizados.	14
4	Comparación entre diferentes alimentos en cuanto al contenido de proteínas (López y García, 1997).	15
5	Principales especies de hongos no tradicionales y los precios de transacción en el mercado interno (Valdebenito, 2003).	20
6	Información solicitada a los participantes de la mesa de degustación de los digueños de acuerdo al tratamiento de conservación y preservación al que fueron sometidos.	32
7	Resultados de pruebas bioquímicas realizadas a las cepas bacterianas aisladas de <i>Cyttaria espinosae</i> .	39
8	Promedio de inhibición de las 9 cepas bacterianas asociadas a <i>Cyttaria espinosae</i> por acción de los extractos naturales con actividad antimicrobiana conocida.	40
9	Promedios de inhibición del desarrollo de dos bacterias fitopatógenas por acción de los extractos de <i>Cyttaria espinosae</i> .	47
10	Promedios de inhibición del desarrollo de <i>Fusarium</i> sp. y <i>Botrytis cinerea</i> por acción de los extractos de <i>Cyttaria espinosae</i> al tiempo cero y luego de 8 meses de mantener el extracto a -20°C.	51
11	Promedios y porcentajes de inhibición del desarrollo de los hongos <i>Fusarium</i> sp. y <i>Botrytis cinerea</i> , por acción de los extractos de <i>Cyttaria espinosae</i> en las formulaciones alcohólicas, acuosas y puras.	52
12	Tolerancia a diferentes concentraciones de sal de las cepas bacterianas aisladas de <i>Cyttaria espinosae</i> .	55

INDICE DE FIGURAS

Número	Título	Página
1	Partes de un Hongo (on line).	7
2	Hongos comestibles <i>Boletus luteus</i> y <i>Lactarius deliciosus</i> .	18
3	Estructuras de <i>Cyttaria</i> sp. (Carrillo, 2003).	21
4	<i>Cyttaria espinosae</i> en agallas de <i>Nothofagus obliqua</i> (© Ortiz, 2012).	21
5	Microorganismos asociados a <i>Cyttaria espinosae</i> en medio de cultivo Plate Count.	38
6	Promedios de inhibición del extracto natural P01, sobre las cepas bacterianas aisladas de “digueños” y comparadas con el control positivo Gentamicina al 0,5% 2mg/ml.	41
7	Representación de los porcentajes de aceptación de los “digueños” tratados con antimicrobiano y sometidos a los tratamientos de conservación y preservación.	42
8	Representación de los porcentajes de aceptación de los “digueños” sin antimicrobiano y sometidos a los tratamientos de conservación y preservación.	43
9	Microorganismos asociados a <i>Cyttaria espinosae</i> luego de ser sometidos a distintos procesos de conservación y preservación.	44
10	Promedios de inhibición de <i>Erwinia caratovora</i> por acción de los extractos de <i>Cyttaria espinosae</i> . Evaluados al tiempo cero y luego de tres meses de mantener el extracto a -20°C.	45
11	Promedios de inhibición de <i>Pseudomonas syringae</i> por acción de los extractos de <i>Cyttaria espinosae</i> . Evaluados al tiempo cero y luego de tres meses de mantener el extracto a -20°C.	46
12	Comparación de Promedios de inhibición del desarrollo de <i>E. caratovora</i> y <i>Ps. syringae</i> por acción de los extractos de <i>Cyttaria espinosae</i> .	48

13	Promedios de inhibición del desarrollo de <i>Fusarium</i> sp. por acción de los extractos de <i>Cyttaria espinosae</i> a tiempo cero y luego de 8 meses de mantener el extracto a -20°C.	49
14	Promedios de inhibición de <i>Botrytis cinerae</i> por acción de los extractos frescos de <i>Cyttaria espinosae</i> y evaluado al tiempo cero y luego de 8 meses de mantener el extracto a -20°C.	50
15	Comparación de promedios de inhibición del desarrollo de <i>Fusarium</i> sp. y <i>Botrytis</i> sp. por acción de los extractos de <i>Cyttaria espinosae</i> .	52
16	Resultados antibiograma para <i>Erwinia carotovora</i> y <i>Pseudomonas syringae</i> .	55
17	Resultados antibiograma <i>Fusarium</i> sp. y <i>Botrytis</i> sp.	56

1.- INTRODUCCIÓN

La utilización de los hongos comestibles se conoce desde hace siglos, especialmente en los países como China, donde existe una gran cultura relacionada con este tipo de productos. El consumo de los hongos comestibles ha sido parte importante del proceso para mejorar ciertas condiciones de salud, incluyendo el cáncer, la diabetes, las infecciones virales y bacterianas (Waser, 1999, Hawksworth 2001, Cui 2003, Lindequist y Julich 2005, Schepetking, 2006). La era de la investigación relacionada con las propiedades medicinales de los hongos se inicia con el descubrimiento de la penicilina, obtenida a partir del hongo *Penicillium notatum* (Miles 1999).

Actualmente los avances en el conocimiento científico y tecnológico han permitido iniciar el conocimiento de las características de este tipo de productos, basándose en el conocimiento de los procesos tradicionales o simplemente naturales, lo que ha generado una creciente industria de la producción de hongos comestibles. Sin embargo, es necesario contar con recursos humano de alto nivel para el desarrollo de la investigación relacionada con todas las propiedades de los hongos comestibles y de las condiciones de cultivo, multiplicación y preservación, lo cual permitirá el desarrollo de la biotecnología moderna aplicada a los hongos comestibles en los países en desarrollo, sobre todo en Latinoamérica (Martínez *et al.*, 2012).

La importancia de los hongos comestibles se basa en el conocimiento que existe del valor nutritivo de algunos hongos, que puede estar centrado en el contenido mineral y vitamínico, similar al de las hortalizas comunes, en las cantidades utilizables de vitaminas del complejo B y C y además en el contenido de minerales como calcio, hierro, fósforo y potasio, los cuales son importantes para una dieta balanceada. Por otra parte, poseen un alto contenido proteico en peso seco y son bajos en calorías, carbohidratos y grasas, lo que los hace ideales como suplementos en las dietas alimenticias (Sommerkamp, 1990).

Los hongos silvestres comestibles a menudo tienen un breve período de vida durante el cual, pueden ser consumidos. Después de este tiempo sufren un fuerte deterioro, por lo que es necesario conservarlos, existiendo una gran variedad de formas para su posterior uso. El principal objetivo de la producción de hongos silvestres comestibles es asegurar la producción sostenible y para ello es necesario conocer su biología y ecología, para de esta forma reducir al mínimo el impacto de los procedimientos de recolección sobre los recursos micóticos y sobre el bosque.

Así como en diversos países del mundo, en Chile, especialmente en la zona Centro-Sur se encuentra el hongo comestible endémico de nuestro país *Cyttaria espinosae*, parásito de especies de árboles nativos del género *Nothofagus*, el cual presenta evidencias de poseer propiedades y características de interés, tanto en el área gastronómica como en la científica (Peredo, 1987).

El desarrollo de éste hongo parásito es estacional, desde fines de agosto a finales de noviembre. Al no existir evidencia de que pueda sobrevivir fuera de su hospedero, la conservación de los bosques nativos es de vital importancia. Debido a esto para que el “digueño”, como es comúnmente conocido, pueda mantenerse durante todo el año, resulta necesario buscar alternativas de conservación y/o preservación que resguarden sus propiedades organolépticas.

Sin embargo, la información existente sobre las múltiples propiedades de diversos hongos comestibles y la poca o nula información especialmente referida al “digueño” es que, en esta investigación se ha propuesto conocer algunas características de dicho hongo, como son su capacidad de actuar como antimicrobiano y algunas alternativas de conservación y/o preservación.

La propuesta de investigación se basa en la hipótesis de que: “Los extractos de *Cyttaria espinosae* de la localidad de Rucamanque presentan actividad antimicrobiana, frente a fitopatógenos como *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae*, *Fusarium* sp. y *Botrytis* sp., independiente de la interacción con los microorganismos asociados.”

Para la comprobación de dicha hipótesis se planteó el objetivo general que dice relación con “Evaluar la actividad antimicrobiana de *Cyttaria espinosae* sometido a distintos procesos de preservación y conservación y la implicancia de sus microorganismos asociados en dicha actividad”.

Los objetivos específicos planteados son:

- 1.- Evaluar la actividad antimicrobiana de *Cyttaria espinosae* sobre microorganismos de importancia agrícola como *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae*, *Fusarium* sp. y *Botrytis* sp.
- 2.- Determinar las características organolépticas de *Cyttaria espinosae*, bajo distintos métodos de conservación y preservación.
- 3.- Evaluar la presencia de *Pseudomonas fluorescens* y microorganismos asociados a *Cyttaria espinosae*, recolectados en el predio Rucamanque, tanto en fresco como en los sometidos a tratamientos de conservación y preservación.
- 4.- Evaluar la inhibición de los microorganismos asociados a *Cyttaria espinosae* mediante la aplicación de extractos naturales, con propiedades antimicrobianas conocidas.

2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Antecedentes generales sobre los hongos comestibles y sus propiedades funcionales y medicinales.

El Reino Fungi comprende más de 100.000 especies. Los hongos son organismos eucariontes, uni o pluricelulares, con una pared celular formada por quitina y su nutrición es por absorción. Todos son heterótrofos y pueden reproducirse en forma sexual o asexual (Malajovich, 2006). Los hongos viven de la materia orgánica, ya sea viva o muerta, la cual degradan para alimentarse de ella (Guzman y Salmones 2010).

Los hongos han formado parte de la dieta alimenticia humana desde tiempos inmemoriales, se emplearon como alimento y medicina aún antes de que el hombre entendiera el uso de otros organismos, como lo demuestran los restos de un hongo hallado a principios de la era terciaria, las pinturas de hongos de carácter religioso que datan del 3.500 A.C encontradas en cuevas del Paleolítico, en Mesoamérica se han encontrado figuras de piedra representando hongos, cerca del límite entre Austria e Italia se encontraron restos humanos del 3.300 A.C. preservados en hielo, junto a los cuales habían hongos secos de la especie *Piptoporus betulinus*, que posiblemente utilizaban para iniciar el fuego y tratar heridas. Las civilizaciones Maya y Azteca los usaban en rituales religiosos y en medicina. Muchos pueblos antiguos atribuían a los hongos propiedades mágicas tales como proveer fuerza sobrehumana, encontrar objetos perdidos y conducir el alma al plano de los dioses. En la mitología europea antigua, los hongos se asociaban a las estaciones lluviosas y tormentosas y se creía que estaban formados por rayos y tormentas. Los antiguos romanos, si bien los denominaron “fungus”, probablemente derivado de funus ago o “portador de la muerte”, adoptaron el consumo de hongos en su dieta. También la micología medicinal encuentra sus raíces en los usos tradicionales de los hongos en la antigua medicina de Oriente (Curvetto, 2009)

Durante siglos, los cuidadores chinos de la salud emplearon hongos para tratar diferentes enfermedades. Ellos valoraron el poder de algunos hongos como de origen divino, es así como una diosa estaba asociada con el Reishi, *Ganoderma lucidum*, el hongo medicinal por excelencia. Algunos, solo podían ser consumidos por los emperadores a quienes se creía les otorgaba la inmortalidad. Ciertos hongos fueron usados aún más allá de la medicina: en algunas escuelas de Taoísmo se los usaba como purificadores y promotores de la mente y del espíritu (Chang, 1999). Hacia finales de los años sesenta tanto los científicos Orientales como los Occidentales comenzaron a investigar los mecanismos por los cuales ciertos hongos tenían efectos positivos sobre la salud. La primera investigación exitosa puso al descubierto los efectos antitumorales de extractos (obtenidos en agua caliente) de varias especies de hongos (Ikekawa *et al.*, 1969).

En 1965, en Japón se desarrolló una preparación muy popular y eficaz a partir del hongo *Trametes versicolor* (conocido previamente como *Coriolus versicolor*). Un péptido de este hongo conocido con el nombre de “Krestin” fue aceptado para el uso contra varios tipos de cáncer y fue cubierto por el plan oficial de salud japonés. El Krestin contiene 75% de glucanos y 25% de proteína (Hiroshi, 1993). En los años 90, este compuesto significó el 25% de las drogas anticáncer en Japón, con ventas por 350 millones de dólares (Mizuno, 1999). Un producto similar se desarrolló en China con otra cepa de *Trametes versicolor*, bajo el nombre “peptide” (Rau *et al.*, 2009).

Es así que durante los últimos 20 años, el interés en los aspectos medicinales de los hongos aumentó notablemente como lo demuestra la gran cantidad de estudios científicos realizados por diversos grupos de investigación, principalmente de hospitales e instituciones de investigación en Europa, Japón, China y los Estados Unidos, con trabajos en un amplio espectro de diferentes publicaciones. Pero a partir del 2000 aparece una publicación especialmente dedicada al aspecto medicinal de los hongos para contribuir como fuente de información cubriendo diferentes aspectos de esta excitante especialidad.

Es importante especificar que los hongos que se ven crecer en los bosques constituyen sólo los cuerpos fructíferos o carpóforos de hongos superiores. La función de estos “frutos” es la de diseminar las esporas que permitirán el establecimiento de nuevos organismos. En el subsuelo se encuentra el cuerpo principal del hongo, compuesto de filamentos llamados hifas que conforman una tela ramificada conocida como micelio.

Los hongos silvestres comestibles han sido recolectados en bosques de la antigua Grecia y Roma, siendo estos muy apetecidos principalmente por los estratos socioeconómicos más altos, más que por la población en general. Pero es en China, donde existen registros del consumo de hongos silvestres como un alimento, incluso desde varios siglos antes del nacimiento de Cristo, no sólo por sus propiedades nutricionales, sino también por sus propiedades medicinales. En la actualidad, estas propiedades siguen siendo igual de importantes que hace siglos, dejando en evidencia el que China sea el líder en exportaciones de hongos comestibles cultivados (Wang, 1987, Aaronson, 2000).

En general se exagera sobre la amenaza representada por las especies venenosas y letales. Los episodios de muertes y envenenamientos son pocos y raros comparados con el consumo cotidiano y seguro de las especies silvestres, pero, en algunas sociedades, la publicidad y los estilos culturales siguen sembrando temor respecto a los hongos silvestres. Esto acontece con mayor frecuencia en los países desarrollados y ha llevado indudablemente a la creencia generalizada de que el uso mundial de los hongos silvestres comestibles se da en pequeña escala, creencia que posee un valor negativo (Cuadro 1) ya que el consumo de los hongos silvestres comestibles es extensivo e intensivo, aunque los modelos de uso sean variables.

Los hongos silvestres comestibles de mayor valor comercial son en general de tipo ectomicorrizógeno, es decir, su micelio rodea y penetra las raíces de los árboles y establece una relación simbiótica con ellos. Los hongos toman del suelo diversos nutrientes minerales y los trasladan al árbol, ayudándole a desarrollarse en terrenos poco fértiles, y reciben productos elaborados por el vegetal. Así, se encuentran mayores cantidades de cuerpos fructíferos en los

suelos más pobres y en los bosques en etapas de recuperación, como aquellos que fueron utilizados por la industria forestal o para la agricultura o que fueron incendiados.

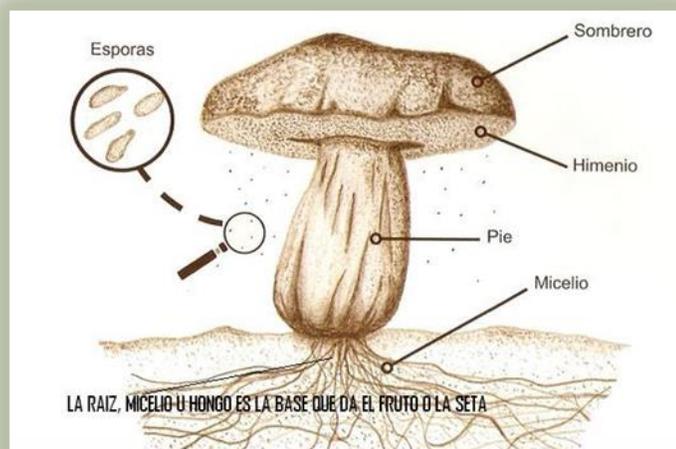


Figura 1. Partes de un Hongo (on line).

Cuadro 1. Número de especies de hongos silvestres comestibles y medicinales a nivel mundial (Boa, 2005).

Categoría	N° de Especies	% Total
1.- Sólo comestibles	1009	43
2.- Comestibles y medicinales	88	4
3.- Sólo alimento	820	35
4.- Alimento y medicinal	249	11
5.- Sólo medicinal	133	6
6.- Otros usos	29	1
Total de especies silvestres útiles	2327	
TODOS sólo comestibles (1+2)	1097	
TODOS alimentos (3+4)	1069	
TODOS medicinales (2+4+5)	470	

El cultivo de hongos comestibles es una actividad que se desarrolla desde hace más de doscientos años en Europa con el cultivo del Champiñón (*Agaricus* sp.), y en Asia con el cultivo

de Shiitake (*Lentinula* sp.) y oreja de negro (*Auricularia* spp.). Estos sistemas productivos eran considerados extensivos, dado que en el caso del Champiñón se recolectaba el estiércol de caballo (sustrato natural de la especie) y se lo acondicionaba en graneros, dejando libre su ciclo productivo a las condiciones climáticas reinantes. En tanto, los hongos como orejas de negro y gírgolas, entre otros, son colectadas de árboles y troncos en los bosques.

Con el correr del tiempo, la demanda provocó que se generaran sistemas productivos más eficientes y por ende rentables. Así, se fundaron centros de investigación de excelencia en el cultivo intensivo, entre los que se destacan el INRA (Francia) y el Centro de Investigación del Champiñón (Holanda).

Esta tecnología llegó al Nuevo Mundo a fines del siglo XIX y mitad del XX, periodo en el que se desarrollaron emprendimientos productivos y se establecieron los primeros centros de Investigación con relación a la biología y la producción del Champiñón principalmente. Por esos comienzos, Estados Unidos lideraba el desarrollo tecnológico de dicha especie. No fue sino hacia la mitad del pasado siglo, en virtud del mejoramiento del paquete tecnológico integral de producción, que este sistema productivo se consolidó en varios países hispanoamericanos, con tecnología importada desde ese país y Europa.

Para comprender la evolución del cultivo, vale destacar que en los últimos cuarenta años la producción mundial de hongos comestibles se incrementó más de treinta y cinco veces: desde 24.000 toneladas en 1962 a 8,5 millones de toneladas en el año 2002, y ese crecimiento se dió principalmente en los últimos quince años, colocando el valor mundial de los hongos cultivados en unos 23 mil millones de dólares.

También se observó un cambio en las especies cultivadas, en los comienzos de la década de los años '80, el champiñón representaba más del 70% de la oferta mundial. Solamente el 2,8% de dicha producción correspondía a *Pleurotus ostreatus* (gírgola) y el 14,3% a Shiitake. En tanto, las proyecciones actuales sitúan a la producción de gírgolas en segundo lugar, representando el 20% de la producción mundial de hongos comestibles. Sólo China produjo 1.722.645 t de

gírgolas en 2000, lo que representa un incremento del 70% de la producción total de hongos de ese país. En Argentina, la producción de hongos se desarrolla a partir de la década de los años '50 con una sola especie, el Champiñón, que se mantiene hasta los '90, cuando se comienza con los primeros cultivos de Gírgolas.

El valor e importancia de los hongos comestibles actualmente incluyen propiedades anticancerígenas, antibióticas (antimicrobianas: antivirales, antibacterianas, antiparasitarias), antioxidantes, reductoras del nivel de colesterol y la hipertensión, antitrombóticas y antidiabéticas (Chang, 2004).

A partir de estas propiedades, se estima que ya se generan operaciones comerciales de alto valor agregado superiores a los 6 billones de dólares en los mercados internacionales de la industria alimenticia y farmacéutica. Asimismo, se observa una creciente demanda de los productos derivados de hongos comestibles con propósitos terapéuticos y de prevención de enfermedades en Europa, Norteamérica, el Sureste de Asia y Latinoamérica, a través de suplementos alimenticios, cápsulas, tabletas y bebidas tonificantes con compuestos bioactivos o extractos fúngicos purificados (Smith *et al.*, 2002, Chang, 2004,).

Las propiedades funcionales de los hongos comestibles pueden concentrarse mediante extractos acuosos y alcohólicos, a través de los cuales pueden obtenerse lectinas y compuestos de alto peso molecular, tales como polisacáridos, glicoproteínas, α -glucanos, β -glucanos, heteroglicanos, proteoglucanos, proteoheteroglicanos, polisacaropéptidos, terpenoides, y proteínas fúngicas inmunomoduladoras. Se ha demostrado ampliamente que estas macromoléculas bioactivas purificadas tienen propiedades funcionales sin efectos secundarios adversos (Sullivan *et al.*, 2006).

En general, los principales mecanismos de acción de las macromoléculas con propiedades medicinales de los hongos comestibles consisten en activar, estimular y reforzar el sistema inmunológico del organismo. De esta forma, son capaces de proteger células sanas evitando su

conversión a cancerosas, de prevenir la metástasis, y de inhibir y/o detener la formación de tumores (Mizuno 1999, Lull *et al.* 2005, Wasser 2002).

Otro ejemplo de los beneficios de los hongos son las propiedades anti-HIV de *Grifola frondosa*, conocida también por los nombres comunes de Maitake, maitake fracción D, extracto de maitake, beta-glucano, es un hongo comestible cuyo extracto se comercializa como un suplemento dietético en los Estados Unidos y Japón, bajo el nombre de “maitake D-fracción” que es un beta-glucano con efectos sobre el sistema inmune en animales y estudios de laboratorio, aun cuando no hay evidencia clínica convincente hasta la fecha. Sin embargo, en publicaciones de revistas médicas se informa que es eficaz en el tratamiento o la prevención del cáncer en los seres humanos, aunque en seres humanos las investigaciones están en ejecución.

Efectos beneficiosos se le han reconocido en Japón y en EE.UU, donde el Instituto Nacional del Cáncer (NCI, 1992) confirmó la eficacia de la fracción D contra el HIV, y un año después lo hizo el Instituto Nacional de Salud de Japón. Se indicó que la fracción D podía prevenir la destrucción de las células T infectadas por HIV *in vitro* hasta en un 97%. Esto es muy importante porque el conteo de las células T de un paciente es una referencia de la progresión del HIV hacia el desarrollo del SIDA. Es más, los investigadores del NCI admitieron que el extracto de Maitake es tan poderoso como el AZT (la droga normalmente prescrita para el SIDA, y la única aceptada por la FDA en esa época) pero sin los efectos tóxicos colaterales asociados al AZT. Estos prestigiosos institutos de investigación confirmaron en experimentos de laboratorio que la fracción D refuerza la actividad de otras células inmunes así como de los linfocitos T.

Debido a que los hongos comestibles se han ido integrando cada vez con mayor fuerza a la dieta, especialmente como complemento en las dietas de los vegetarianos o personas enfermas, es una necesidad el conocer las propiedades y beneficios que los hongos proporcionan, esto ha permitido una importante actividad científica en el sentido de ampliar las investigaciones que permitan conocer tanto las cualidades nutricionales de los hongos como las propiedades benéficas cada uno posee.

Es así como se han desarrollado métodos para la extracción, fraccionamiento y purificación de diversas sustancias presentes tanto en los basidiocarpos como en los micelios de diversas especies de hongos (Mondino, 2001).

Entre los hongos comestibles que más se han estudiado se encuentran los del género *Pleurotus* que poseen de acuerdo a diversos estudios, propiedades antioxidantes (Elmastas *et al.*, 2007) y antibacterianos (Karamau *et al.*, 2010), también se ha estudiado hongos del género *Lentinus* que posee, entre otras, actividad antioxidante (Thetsrimuang *et al.*, 2011) y antitumoral (Wu y Hansen, 2007), también se sabe que hongos del género *Agaricus* poseen actividad antioxidante (Barros *et al.*, 2008) y otro hongo con características de interés aunque no es comestible es del género *Ganoderma*, que entre sus propiedades se puede destacar la actividad antimicrobiana (Bhosle *et al.*, 2010), lo cual lo hace ser considerado como nutraceutico ya que es consumido a través de cápsulas o tabletas, como complemento alimenticio.

Todo este conocimiento ha generado un campo de investigación importante que permite dar respuesta a las demandas de productos más saludables por parte de una población cada vez mayor.

Por otra parte a otro grupo de hongos se les ha definido como “alimentos funcionales”, concepto que la Academia de Ciencias de Estados Unidos en 1994 definió como “aquellos alimentos que abarquen productos potencialmente saludables, incluyendo cualquier alimento modificado o ingredientes de alimentos que puedan proveer un beneficio para la salud más allá de

los nutrientes que contiene (Smith *et al.*, 2002), este mismo autor menciona que actualmente diversas investigaciones han confirmado la eficacia médica de los diversos hongos y han permitido revelar moléculas bioactivas a partir de estos mismos, por esto el término “hongos medicinales” ha venido ganando reconocimiento a nivel mundial.

Respecto del dihueñe se tienen antecedentes que se han realizados estudios que permiten determinar que aparte de los aportes nutricionales, también tienen propiedades anticancerígenos como lo demuestran los estudios que se están llevando a cabo en la Universidad de Talca, en donde se determinó la composición proximal y actividad biológica de colecciones chilenas de *Cyttaria berteroi*, *C. espinosae*, *C. harioti*, *C. johowii* y *C. darwinii*, además, el contenido de proteína cruda, lípidos, cenizas y carbohidratos fue similar al de otros hongos comestibles (Schmeda y Razmilc 1999).

2.2. Valor Nutricional de los hongos Comestibles.

Los Hongos comestibles son ampliamente consumidos en el mundo por su excelente sabor, aroma, y textura. Sin embargo, aún es poco conocido su gran potencial como alimento con propiedades nutricionales, funcionales y medicinales que promueven la salud. Estas propiedades son únicas y diferentes a las aportadas por otros alimentos. En base seca, los hongos comestibles son buena fuente de proteínas (21.7 – 23.9%; con una digestibilidad de 80 a 87%), con un balance adecuado de vitaminas (A, B₁, B₂, B₆, B₁₂, C, D₂, D₃, niacina, pro-vitamina D₂), minerales (hierro, potasio, fósforo, cobre, selenio, calcio, magnesio, manganeso, zinc) y fibra dietética (47.3g/100g) (Cuadro 2 y 3). Asimismo, tienen un bajo contenido de grasas (3,2%) y carbohidratos digeribles (1-5%) (Martínez *et al.*, 2012).

Entre los hongos que se han estudiado y de los cuales se tienen datos respecto a sus contenido nutricional es *Pleurotus ostreatus* (Cuadro 2), así como también *Agaricus bisporus* y *Shiitake*, que son los hongos más cultivados y consumidos en el mundo.

Cuadro 2. Contenido Nutricional de *Pleuross ostreatus*.

Contenido		Valor
Agua	(%)	86 – 88
Proteínas	(%)	20,75
Carbohidratos	(%)	3-5
Grasa	(%)	2,21
Calcio	(%)	0,226
Fósforo	(%)	1,197
Potasio	(%)	3,543
Magnesio	(%)	0,569
Sodio	(%)	0,106
Hierro	(mg/kg)	199,22
Cobre	(mg/kg)	46,06
Zinc	(mg/kg)	68,1
Vitaminas		B, B2, B6, B12, C, D, E y K
Fibra	(%)	12,14

Es importante considerar que un análisis del valor energético o calórico de los alimentos está basado en la composición química de los alimentos. Sin embargo, los compuestos químicos deben digerirse y absorberse en el sistema intestinal antes de que puedan ser de valor nutricional.

Cuadro 3. Contenido Nutricional de los hongos comestibles más utilizados.

	Champiñón (por 100g de porción comestible)	Pleurotus (por 100g de porción comestible)	Shiitake (por 100g de porción comestible)	CDR hombres	CDR mujeres
Energía (Kcal)	26	26	34	3,000	2,300
Proteínas (g)	1,8	1,8	2,24	54	41
Lípidos totales (g)	0,3	0,3	0,49	<100	<77
AG saturados (g)	0,07	0,07	-	<23	<18
AG monoinsat. (g)	Trazas	Trazas	Trazas	>57	>43
AG polinsat. (g)	0,17	0,17	-	10-20	8-15
Ω-3 (g)	0,133	0,133	-	0,33-3,3	0,25-2,6
Ω-6 (g)	0,032	0,032	-	1,3-16,5	1,2-10,4
Colesterol (mg)	0	0	0	<300	<230
Hidratos de C (g)	4	4	6,79	375-450	288-345
Fibra (g)	2,5	2,5	2,5	38	29
Agua (g)	91,4	91,4	89,74	1,000-2,000	1,000-2,000
Calcio (mg)	9	9	2	800	800
Hierro (mg)	1	1	0,41	10	18
Yodo (µg)	3	3		140	110
Magnesio (mg)	14	14	20	350	330
Zinc (mg)	0,1	0,1	1,03	15	15
Sodio (mg)	5	5	9	<2,400	<2,400
Potasio (mg)	470	470	304	3,500	3,500
Fósforo (mg)	115	115	112	700	700
Selenio (µg)	9	9	5,7	70	55
Tiamina (mg)	0,1	0,1	0,015	1,2	0,9
Riboflavina (mg)	0,41	0,41	0,217	1,8	1,4
Niacina (mg)	4,6	4,6	3,877	20	15
Vitamina B6 (mg)	0,1	0,1	0,293	1,8	1,6
Ácido fólico (µg)	23	23	18	400	400
Vitamina B12 (µg)	0	0	0	2	2
Vitamina C (mg)	4	4	0	60	60
Vitamina A (µg)	0	0	0	1000	800
Vitamina D (µg)	18	-	0,5	5	5
Vitamina E (mg)	0,12	0,12	0	12	12

Análisis químicos realizados a diferentes alimentos y hongos, basados en 100 grs de peso fresco indican que los hongos poseen un valor intermedio, donde primero están los pescados y huevos luego los hongos y enseguida se ubican las frutas y vegetales, como es en el contenido de proteínas (Cuadro 4), (López y García, 1997).

Cuadro 4. Comparación entre diferentes alimentos en cuanto al contenido de proteínas (López y García, 1997).

Alimentos	Contenido de proteínas (%)
Salmón	21,0
Harina	13,3
Huevos	12,9
Hongos comestibles	3,7
Leche	3,5
Zanahoria	1,1

En cuanto al contenido calórico de los hongos los investigadores mencionan que es bajo, debido a que posee pocas cantidades de carbohidratos y grasas, con valores que van entre un 4,4% y 0,3% respectivamente. Comparando la posición calórica entre los hongos, los huevos, el salmón y la leche, los hongos se encuentran en el cuarto lugar con un 28% a diferencia de los huevos que ocupan el primer lugar con un 163%, además son valores que no han variado en el tiempo (López y García, 1997).

Es importante considerar que los contenidos de lípidos y grasas de los hongos son bajos, con valores que se encuentran alrededor del 2%, el 75% de este valor corresponde a ácido linoleico que es el único ácido graso requerido en la dieta humana, además que estas grasas le dan a los hongos sabores y aromas que son agradables al momento de ser consumidas. Por otra parte el 5% del peso seco de los hongos corresponde a glicógeno que es un azúcar que puede ser empleado por el organismo para su metabolismo, existe también un porcentaje de manitol y trehalosa que no pueden ser utilizados por los humanos.

Junto con lo anterior los hongos poseen una cantidad de vitaminas necesarias para el ser humano como es la riboflavina que varía entre un 29 a un 38%. Los minerales se encuentran en los hongos comestibles en una cantidad similar a la que poseen los vegetales.

2.3 Actividad Antimicrobiana de hongos comestibles.

Junto con la importancia que tiene el conocer las características nutricionales de los hongos comestibles, el conocimiento de los resultados de las investigaciones relacionadas con la búsqueda de productos naturales con actividad antimicrobiana, tiene especial importancia en los últimos años dada la presencia de muchas cepas bacterianas multirresistentes, lo que se ha convertido según algunos autores y la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la mayor emergencia y el problema de salud pública más importante en la actualidad (Hearst *et al.*, 2009).

Es así, que existe evidencia en base a estudios realizados en extractos de Shiitake, *Lentinula edodes* entre otros, que permiten considerarlos como una posible fuente natural de actividad antimicrobiana (Kistzberger *et al.*, 2007). Son varias las investigaciones que ponen de manifiesto el hecho de que los principios activos contenidos en los extractos clorofórmicos, acuosos y en acetato de etilo a partir del cuerpo fructífero del Shiitake, exhiben actividad antibacteriana sobre un buen número de microorganismos. Así mismo, se ha reportado dicha actividad en micelio y medio de cultivo proveniente de la fermentación en estado sumergido de Shiitake.

Es importante notar que la actividad antimicrobiana varía de acuerdo al tipo de extracto evaluado y que en algunos casos se atribuye la actividad de los mismos a compuestos tales como la lentionina, derivados disulfuros, ácido gálico y el lentinan.

Otro ejemplo lo proporciona el trabajo de investigación realizado por Haydelba y colaboradores realizaron el año 2009, donde evaluaron un extracto del hongo marino *Aspergillus ochraceus*, aislado de *Rhizophora mangle*, con una mezcla de acetona/cloroformo/etanol (3:2:1) el cual fue fraccionado empleando cromatografía en capa fina preparativa. Con estas fracciones se elaboraron antibiogramas las que mostraron una actividad inhibitoria preferencial sobre las bacterias Grampositivas.

El empleo de extractos vegetales para el control de plagas y enfermedades en el marco de una agricultura sostenible constituye una alternativa promisorio, debido a su elevada efectividad, bajo costo y no menos importante, compatibilidad con el medioambiente. Estos bioproductos se caracterizan por la presencia de determinados compuestos de origen natural, los cuales forman parte de las estrategias defensiva de las plantas (Villalobos, 1996). Esto ha hecho que se busque la forma de aprovechar las cualidades de estos productos y a su vez incentivar la investigación en cuanto al conocimiento de los efectos de los diferentes compuestos como los nitrogenados, fenólicos y terpenoides (Harborne, 1993), muchos de los cuales muestran actividad como antiapetitivos (Dominí, 1995), antivirales, antimicrobianos o repelentes, que permiten su utilización en la protección de los cultivos permitiendo un aumento en la producción de productos y especialmente en su calidad, haciéndolos más aceptables por parte de la población, que busca productos que sean más saludables sin productos químicos y además que posean una mayor capacidad de degradación (Funes, 1997).

2.4 Hongos Comestibles en Chile.

En el mundo los hongos silvestres comestibles han sido recolectados y consumidos por la gente durante miles de años. Los registros arqueológicos revelan especies comestibles asociadas con las poblaciones chilenas de hace 13.000 años (Rojas, 1995), sin embargo en Chile solo en los últimos años se ha iniciado el consumo de hongos, por lo que muchas de las especies cultivables no tienen un buen mercado en nuestro país. Algunos hongos comestibles cultivables se encuentran disponibles tanto en la naturaleza, como en laboratorios que comercializan sus semillas.

Los principales hongos silvestres de Chile son los de la especie *Boletus luteus* y *Lactarius deliciosus* (Figura 2), los cuales en su gran mayoría se destinan al mercado externo, principalmente porque es donde alcanzan los mejores precios, por otro lado, el consumo interno es muy limitado y está básicamente compuesto por hongos deshidratados destinados a las

industrias de alimentos elaboradoras de salsas de tomate y sopas en sobre, además de empresas envasadoras que compran a granel y los venden envasados a los supermercados.



Figura 2. Hongos comestibles *Boletus luteus* y *Lactarius deliciosus*.

Debido a que los hongos silvestres son un producto altamente perecible, y a que aún la demanda nacional es menor que la producción, es necesario preservarlos; de esto nace la importancia de conocer buenas y mejores maneras de conservación, para cada tipo de hongo. Además, para efectos de exportación, sólo puede realizarse en forma procesada debido a razones de mercado y a las grandes distancias que nos separan de los mercados de destino.

Cabe señalar que las formas procesadas preferidas son la deshidratación, el salmuerado, el congelado y las conservas. En la deshidratación se procesan hongos enteros, en trozos o en polvo. Para la congelación, el salmuerado y la conservería se usan solamente hongos enteros o en trozos.

Las exportaciones de hongos silvestres, corresponden principalmente a hongos deshidratados y salmuerados cuyos principales destino son Alemania, Francia y EE.UU. De acuerdo a las estimaciones realizadas por Decofrut, Chile es el principal país productor de hongos silvestres en Latinoamérica, con una producción de 11.000 t anuales. Latinoamérica como un todo produce cerca de 20.000 t anuales, es decir la participación de Chile asciende al 55%. En cuanto a los hongos cultivados, Chile tiene el segundo lugar en producción con 7.400 t/año. La producción total de hongos cultivados en Latinoamérica es cercana a las 48.000 t de ellas el 56% es producido en México y el 15% por Chile (FIA, 1996).

Entre los años 2006 a 2007 Chile se ha perfilado como uno de los mayores exportadores mundiales de hongos silvestres, sólo superado por China, Rusia y Polonia. Esta actividad entrega retornos superiores a los 50 Millones de Dólares cada año, siendo, sin lugar a dudas, la actividad más importante relacionada a con la explotación, procesamiento y comercialización de Productos Forestales No Madereros (PFNM) en Chile. Se estima que en esta actividad participan directamente unas 40 mil personas entre las Provincias de Valparaíso a Magallanes las que se dedican directamente a la recolección y/o procesamiento y más de 35 empresas exportadoras concentradas entre la Región del Maule y la Región del los Ríos. Incluso existen localidades que sólo se dedican a esta actividad durante el Otoño e Invierno, como por ejemplo la comuna de Empedrado (Región del Maule) que es considerada la capital de la recolección de hongos silvestres de Sudamérica (Cisterna, 2007).

La oferta de los hongos silvestres comestibles no tradicionales está presente en la mayoría de las ferias públicas del centro sur de Chile. En el Cuadro 5 se muestran los precios alcanzados por algunos hongos silvestres comestibles no tradicionales, destacando el precio aproximado alcanzado por *Cyttaria* sp.

La producción de algunos hongos como portobello es de 50 toneladas/año; 100 toneladas anuales de ostra y 20 t/año del hongo Shiitake, para el mercado fresco nacional, principalmente destinada a los supermercados y las principales abastecedoras del país como la Vega Central, y la de Concepción¹.

¹ Diario el Sur, 26 de marzo del 2012, Ricardo Sánchez Devoto. Frutos del Huerto.

Cuadro 5. Principales especies de hongos no tradicionales y los precios de transacción en el mercado interno (Valdebenito *et al.*, 2003).

Hongo		Rango de Precios (*)	
Nombre Científico	Nombre Común	Precio a Media Temporada (\$/Kg)	Precio al Comienzo y Término de temporada (\$/Kg)
<i>Fistulina hepatica</i>	<i>Lengua de Vaca</i>	800	1.500
<i>Boletus loyus</i>	<i>Loyo</i>	700 unidad	1.000
<i>Clavaria coralloides</i>	<i>Changle</i>	1.000	2.000
<i>Ramaria flava</i>	<i>Changle</i>	1.000	2.000
<i>Ramaria valdiviana</i>	<i>Changle</i>	1.000	2.000
<i>Cyttaria spp.</i>	<i>Dihueñe</i>	1.000	3.000
<i>Gyromitra antarctica</i>	<i>Chicharrón del monte</i>	800	1.500
<i>Gyromitra esculenta</i>	<i>Chicharrón del monte</i>	800	1.500
<i>Grifola gargal</i>	<i>Gargal</i>	500	1.500

(*) Rango de Precios obtenidos de ferias libres y vendedores ambulantes desde la región del Bío-Bío a la Región de La Araucanía.

2.5 Características generales de *Cyttaria espinosae*.

Entre los hongos comestibles típicos de la región de La Araucanía se encuentra *Cyttaria espinosae*, es un hongo *Ascomycete* perteneciente a la familia *Cyttariaceae*. Es un hongo, comestible endémico de la zona centro-sur de Chile, se conoce comúnmente con el nombre de dihueñe o dihueña, de color blanco-anaranjado, de estructura globosa y de superficie gelatinosa. El dihueña presenta una membrana blanca, que cubre por completo al hongo, en esta membrana es donde se encuentran los apotecios, parte reproductiva del hongo, donde en su interior se desarrollan las ascas y ascoesporas. Este hongo es un parásito estricto y específico del género *Nothofagus*, específicamente de *Nothofagus obliqua* causando agallas cancerosas en el árbol, de las cuales emergen los cuerpos fructíferos en la época de primavera a verano (Figura 3 y 4).

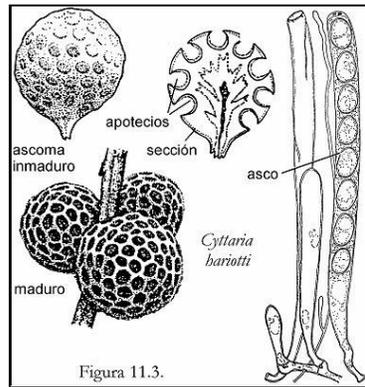


Figura 3. Estructuras de *Cyttaria* sp. (Carrillo, 2003).



Figura 4. *Cyttaria espinosae* en agallas de *Nothofagus obliqua*. (© Ortiz Ana 2012).

Los dihueños son hongos endémicos, típicos de los bosques Andinopatagónicos aunque también existen algunas especies en bosques similares en Nueva Zelanda y Australia (Espinosa, 1926). Ocasionalmente se observa sobre diferentes especies arbóreas, una hipertrofia casi esférica, con corteza similar a la del ejemplar que la alberga y de tamaños variables hasta 12cm, que corresponden a lignotubérculos (Pancel, 2002). Sin embargo, respecto a su epidemiología, no existen estudios analíticos de las condiciones que permiten que se produzca lo que podría ser una enfermedad del roble. Sin duda, hay efectos del clima, reconocidos en el campo, por referencias a años de dihueños o primaveras de larga producción.

El proceso infeccioso no ha sido estudiado. Se conoce que el micelio es perenne; el hongo probablemente por auxinas, induce la formación de hipertrofias o tumores en ramillas, ramas o fuste joven, sobre las cuales fructifica el patógeno (Espinosa, 1926). Estas malformaciones en el eje de la rama o ramilla pueden ser punto de quiebre por viento, a pesar de ello las pérdidas económicas son insignificantes. Y, por otra parte, siendo las los dihueñes muy apetecidos por la gastronomía local, son colectados y vendidos, constituyendo un ingreso importante para los recolectores de algunas regiones.

Información obtenida respecto a la Gastronomía de *Cyttaria espinosae* detalla que usualmente es consumido en fresco, en ensaladas, frito, o en empanadas. Este hongo es parte de la tradición culinaria chilena, por lo que distintas comunas del país como Curanilahue, Cunco, Angol y Curacautín han querido potenciar el rescate de los productos locales y la comercialización del dihueñe como alimento silvestre natural (Rebolledo, 2011).

2.5.1 Mercado de *Cyttaria espinosae*. En cuanto a la producción media del dihueñe, no existen datos actualizados solo se tiene referencia por trabajos de (Smith-Ramírez, 1995), quien entrega una cifra de unos 10 Kg por árbol adulto considerado como “bueno”, mientras que (Kapper, 1998) propone una producción de 16,19 Kg/ha como cifra media, en cuanto a la producción. Dado el carácter muy perecedero del producto, la recolección se realiza en grupos familiares para su venta directa en ferias y mercados o a intermediarios. Aunque las únicas citas a esta especie en la silvicultura son por su carácter de parásito, la instalación del hongo no parece afectar la vitalidad y crecimiento del árbol, por lo que es compatible con el aprovechamiento maderero. La variabilidad interanual es muy fuerte dado el complejo sistema de factores que gobiernan la fructificación del esporocarpo (área basal, diámetro medio, luminosidad, humedad ambiental, temperatura). No existen referencias de productividad.

Los precios de venta varían de acuerdo a la temporada o fecha, es así como al comienzo y término de la temporada el producto es más caro que a mitad de temporada. Esto tiene relación con la cantidad de oferta, siendo mayor la disponibilidad a mitad de temporada, lo que produce una disminución en el precio.

Respecto a la demanda interna y externa del dihueño no existen antecedentes, ya que por tratarse de una actividad informal, no existen registros de los montos transados cada año.

2.6. Microorganismos asociados a hongos comestibles y condiciones de Conservación y Preservación.

Los hongos silvestres comestibles son un producto importante para el consumo y la comercialización, que se realiza en las distintas localidades, y aunque los ingresos obtenidos son bajos, son importantes para complementar la economía alimentaria. El aprovechamiento de éstos se realiza sin actividades que promuevan la propagación natural y la conservación del recurso, ya que la mayoría de los recolectores los aprovechan de bosques ajenos, sin organización para el manejo, ni para darle un valor agregado. En contraste, a esto el creciente pero, pequeño mercado industrial de los hongos comestibles en nuestro país, sale a rebatir este cuestionamiento, ya que al paso del tiempo cada vez existen más productores de hongos comestibles y con ello la presentación de los productos bajo distintas formas de preservación y conservación (Peralta *et al.*, 2006).

Para el caso de hongos comestibles como el shiitake y el champiñón, existen referencias sobre microorganismos asociados a estos hongos, estos problemas o enfermedades que pueden disminuir la calidad y cantidad del producto (FIA, 1996). Sin embargo, en los últimos años se han profundizado las investigaciones sobre la formulación de sustratos de alta productividad. Esto permite un mejor manejo de los hongos comestibles y una disminución de su contaminación con

otros microorganismos durante el proceso de producción. Otro potencial de contaminación es el relacionado con las formas de conservación y preservación de los productos.

Entre los principales microorganismos causantes de enfermedades en los hongos comestibles se encuentra es la cepa bacteriana *Pseudomonas tolosi*, causante de la Mancha bacteriana o “gota”, considerada una de las enfermedades más grave, provocando manchas amarillas de aspecto pegajoso y en forma de gotitas en el sombrerillo (Jae-Soon, 2005). Otra enfermedad causada por bacterias del género *Pseudomonas* es la momificación la cual provocan la apertura prematura de los sombrerillos por la presencia de una serie de hinchamientos del pie del hongo (ITACAB, 2010). También existe la enfermedad de la mancha marrón fúngica causada por *Verticillium fungicola*, el sombrero del hongo está parcial o completamente desteñido de amarillo a marrón (Jae-Soon, 2005).

Finalmente se encuentra la enfermedad nombrada Burbuja seca, causada por el hongo *Verticillium malthussei*, que provoca la aparición de deformaciones, el hongo se recubre de un moho o pelusilla blanco-rosáceo y termina pudriéndose con olor desagradable (ITACAB, 2010). De acuerdo a investigaciones realizadas en el CEBEM, la presencia de *Pseudomonas fluorescens* produce también manchas oscuras y blandas, provocando la pérdida del producto (datos no publicados). Además de los problemas fitopatológicos que estos microorganismos causan en los hongos, es importante tenerlos presentes al momento de realizar los diferentes procesos de conservación y/o preservación.

2.6.1 Conservación y Preservación de Hongos Comestibles. Entre los procesos de conservación más conocidos se encuentra la deshidratación de los hongos silvestres que es sin duda el método que más se emplea para garantizar la disponibilidad del producto a lo largo del año. Asimismo, es conocido que los hongos al desecarse concentran sus sabores y propiedades medicinales. Debido a que resulta arriesgado y costoso transportar los hongos frescos a grandes distancias, las empresas europeas especializadas en este negocio suelen establecer unidades de

procesamiento en los países de mayor producción, como en China. El deshidratado de los hongos puede realizarse de diferentes formas. Algunos utilizan la energía solar, pero así se dificulta el control de calidad; lo más común es usar equipo de convección de aire caliente. El rendimiento en peso que se obtiene al desecar los hongos guarda una relación de 10 a 14 unidades en los frescos por una en los hongos secos, dependiendo del tamaño y de la calidad de la materia prima. Los carpóforos grandes y maduros contienen más agua que los pequeños y jóvenes, por lo que su rendimiento en seco es inferior (UNEP-WCMC, 2003).

Otra de las técnicas empleadas es la conserva en salmuera, en la que también los hongos pueden conservarse (agua, sal y vinagre, opcionalmente); para ello se utilizan los ejemplares más pequeños y firmes. En un sitio próximo a su lugar de colecta, los hongos se escaldan, es decir, se ponen en agua hirviendo durante algunos minutos, según su tamaño; luego se sumergen en agua fría, se escurren y se envasan en recipientes con salmuera. Posteriormente, las empresas que realizan el envasado final colocan los hongos en latas o frascos de vidrio esterilizados y con salmuera recién preparada. Esta forma de conservar los hongos es menos empleada por los industriales, debido a que el manejo de la salmuera y la esterilización son procesos más delicados, además de que los costos de transporte se elevan (UNEP-WCMC, 2003).

Los hongos silvestres también se congelan para ser comercializados ya sea enteros, cortados o en mitades. Para ello, algunos industriales usan túneles de congelación con nitrógeno líquido, lo cual es efectivo pero también más caro (UNEP-WCMC, 2003).

En Chile a partir de la década de los 80's, la industria de las conservas, al igual que el resto de las ramas productivas agroindustriales ha presentado un rápido desarrollo de sus exportaciones, llegando a ser una industria empresarial, que ha formado parte de la cocina, además de proveer alimentos que se encuentran fuera de temporada o son escasos.

En el mercado actual se pueden encontrar variedades de conservas en supermercados, pero la mayoría de estas son importadas, y las producidas en el país son de muy pocas variedades, además cabe mencionar que no existen en la ciudad de Temuco empresas que ofrezcan a los consumidores una variedad de conservas que permitan degustar de nuevos sabores y a la vez acceder a ellos en épocas diferentes a las temporadas de cada fruto y las que existen son pequeñas e incipientes (Huenchual *et al.*, 2009).

Estos antecedentes son los que hacen interesante la investigación relacionada con la factibilidad de conservar dihueños y además conociendo tanto sus características nutritivas como funcionales.

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales e Infraestructura

a.- Infraestructura. La investigación fue realizada en las dependencias del Laboratorio de Microbiología y Rizobiología de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales, perteneciente a la Universidad de La Frontera.

b.- Equipos. El Laboratorio de Microbiología y Rizobiología cuenta con los equipos necesarios para el correcto desarrollo del trabajo de investigación planteado, como son Campana de flujo laminar, estufas de crecimiento, centrifugas, autoclave, refrigeradores, microscopios, etc.

c.- Material. El material que se utilizó corresponde al utilizado normalmente en investigaciones microbiológicas, como: Placas Petri, asas, Tubos de ensayo, Tubos Falcon, material de vidrio, etc. y en especial materiales para la realización de ensayos de sensibilidad a antibióticos y antifúngicos, como discos de papel absorbente, pinzas, tómulas estériles. Etc.

d.- Material Microbiológico y Fitopatógeno. La especie de estudio utilizada en esta investigación fue el hongo *Cyrtaria espinosae* Lloyd, cuyas muestras fueron recolectados durante los meses de Octubre a Noviembre del año 2012 en el predio Rucamanque perteneciente a la Universidad de La Frontera, situado a 12 kilómetros al Noroeste de la ciudad de Temuco de la Región de La Araucanía. Para la realización de los ensayos de sensibilidad se utilizaron los microorganismos *Pseudomonas syringae*, *Erwinia carotovora*, *Fusarium* sp. y *Botrytis* sp. Pertenecientes al cepario del laboratorio de Rizobiología y Microbiología.

e- Medios de Cultivo y reactivos. Se utilizó Agar Plate Count (PC), para el crecimiento de bacterias, Agar Papa Dextrosa (APD) para el crecimiento de hongos, Agar Muller-Hinton (MH) para las bacterias en los antibiogramas respectivos y los reactivos necesarios para las pruebas bioquímicas.

3.2. Metodología.

Para la comprobación de los objetivos planteados en esta investigación, se realizaron distintos protocolos y ensayos, los cuales se detallan a continuación:

3.2.1 Aislamiento de *Pseudomonas fluorescens* y microorganismos asociados a *Cyttaria espinosae*. Técnica de recuento en placa. Entre mecheros, resguardando un ambiente estéril, se tomó las placas Petri con medio de cultivo Agar Plate Count (PC), medio de cultivo general para el crecimiento de bacterias, en los cuales se sembraron pequeños trozos de dihueño en fresco, posteriormente se incubaron por 24 horas a 25°C. Luego de su crecimiento, bajo campana de flujo laminar se seleccionaron las bacterias por color, forma y tamaño y se repicaron en estrías en nuevas placas con medio de cultivo PC, para asegurarse de obtener colonias puras. Una vez obtenidos los cultivos puros, estos fueron conservados a -20°C en Glicerol Peptona, hasta que la realización de las pruebas bioquímicas necesarias para conocer algunas de sus características y/o identificación.

3.2.2 Preparación de inóculos para ensayos de Inhibición. Para la realización de este ensayo se preparó Caldo Nutritivo (CN) del cual se vació 5ml en tubos de ensayo. Estos tubos fueron esterilizados en autoclave a 121°C de 15 a 20 minutos. Luego, bajo campana de flujo laminar y con la ayuda de un asa previamente flameada, se tomó una colonia de bacteria desde una placa con 24 horas de crecimiento, la cual fue inoculada en los tubos con Caldo Nutritivo estéril. Estos tubos inoculados fueron puestos en agitación durante 24 horas. Una vez crecidos se tomó una alícuota, la cual fue sembrada en un nuevo tubo con CN el cual es llevado Skacker a 180 rpm y a 28°C por unas horas, evaluando su desarrollo en un Espectrofotómetro, una vez que se logra tener un cultivo con una D.O. de 0,1, se procede bajo campana de flujo laminar a sembrar estas bacterias, con la ayuda de una tórula estéril, en placas con medio de cultivo Mueller Hilton (MH) para la realización del test de Kirby Bauer conocido también como Técnica de Difusión en Agar para antibiogramas.

Para el crecimiento de los hongos filamentosos, se prepararon placas con medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (APD), las cuales fueron sembradas colocando un trozo de micelio al centro

de la placa e incubando a 28°C hasta el desarrollo del micelio y utilización en los diferentes ensayos.

3.2.3 Preparación de extractos de *Cyttaria espinosae* para su posterior utilización en antibiograma. Las muestras de *Cyttaria espinosae* recolectadas en el predio Rucamanque fueron lavadas con agua potable, y luego enjuagadas con agua destilada estéril. Entre mecheros y manteniendo un ambiente estéril, se hizo un macerado de dihueñe en un mortero estéril y el extracto obtenido del macerado se distribuyó en tubos Eppendorf estériles. Se realizó una centrifugación durante 10 minutos a 10.000 rpm, ésta se realizó las veces que fuera necesaria con el propósito de obtener una gran cantidad de sobrenadante, el cual corresponde al extracto puro utilizado en este estudio y que fue alicuotado en tubos Eppendorf estériles. Con parte de estos extractos puros, se prepararon nuevos extractos agregando agua o alcohol, obteniéndose de esta manera los extractos acuosos y alcohólicos al 50%. Estos extractos se ocuparon inmediatamente en el antibiograma lo cual corresponde al tiempo cero, luego fueron conservados a -20°C.

3.2.4 Antibiograma de los extractos naturales de *Cyttaria espinosae* a través del método de Kirby Bauer (Método de difusión en Agar) (Bauer *et al.*, 1966). El método de Kirby Bauer se basa en que el microorganismo patógeno es inoculado en la superficie de una placa de agar, sobre el cual se colocan discos impregnados con una concentración conocida del antibiótico o producto antimicrobiano, las placas se incuban por 16-18 horas a la temperatura necesaria de acuerdo al microorganismo inoculado. Durante la incubación, el antibiótico difunde radialmente desde el disco a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco. En un punto determinado, la concentración del antibiótico en el medio es incapaz de inhibir al microorganismo en estudio. El diámetro del área de inhibición alrededor del disco corresponde al halo de inhibición.

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos naturales frente a los microorganismos asociados, se sembraron las diferentes bacterias aisladas luego de ser crecidas

en Caldo Nutritivo (CN) y con una D.O. de 0,1. Luego, bajo campana de flujo laminar se toman las placas con Agar Plate Count (PC) y se procedió con la ayuda de una tórula estéril a la siembra de las bacterias correspondientes, en tres direcciones en la placa, procurando que la bacteria tenga un crecimiento uniforme dentro de la placa. Los discos de papel absorbente estériles se depositaron en la superficie del medio de cultivo inoculado, con la ayuda de pinzas metálicas estériles por flameo tras inmersión en alcohol. Se aplica una ligera presión para que queden adheridos al medio de cultivo. Se ubicaron 6 discos, formando una circunferencia dentro de la placa Petri. En cada disco se adicionaron 5µl de cada extracto natural a evaluar. Se utilizó como control positivo, el antibiótico Gentamicina y agua destilada estéril como control negativo. Es importante procurar que los discos queden suficientemente separados uno de otros para que la lectura de resultados sea clara y no hayan interferencias entre la acción de un extracto y otro.

Para la obtención de los inóculos en el ensayo de la evaluación de los extractos de dihueñe frente a *Pseudomonas syringae* y *Erwinia carotovora*, se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en el punto 3.2.2. Luego, estas bacterias fueron sembradas en medio de cultivo PC para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de dihueñe, de acuerdo a lo descrito en el punto 3.2.4. En cada disco se adicionaron 5µl de cada extracto de “digueñe” obtenido según el punto 3.2.3, que corresponden a extracto puro, extracto alcohólico y extracto acuoso. Con sus respectivos controles positivos, el antibiótico Gentamicina, alcohol para el extracto alcohólico y agua destilada estéril correspondiente al control del extracto acuoso.

Para el caso de los fitopatógenos *Fusarium* sp. y *Botrytis* sp. , resguardando un ambiente estéril, entre mecheros se tomaron las placas con APD con los hongos con un crecimiento de alrededor de 2 cm. Luego en las placas se ubican 8 discos de papel absorbente alrededor del crecimiento del hongo, con la ayuda de pinzas metálicas estériles por flameo e inmersión en alcohol. Se procura realizarlo con una ligera presión, para que los discos queden adheridos al medio. En cada disco se adicionaron 5µl de cada extracto que corresponden a extracto puro, extracto alcohólico y extracto acuoso. Con sus respectivo controles positivos, fungicidas, alcohol para el extracto alcohólico y agua para el extracto acuoso. Las placas tanto de bacterias como de hongos se llevan a incubar durante 24 horas a 28°C. Tras este tiempo, se leen los

resultados midiendo el diámetro de los halos de inhibición que aparecen alrededor de los discos de papel.

3.2.5 Tratamientos de conservación y preservación de *Cyttaria espinosae*. Para la realización de los ensayos de conservación y preservación, se utilizaron los dihueños colectados en el Predio Rucamanque, los cuales fueron tratados de diferentes formas. Los tratamientos realizados corresponden a:

- 1.- Conservas de dihueños en Salmuera sin antimicrobiano.
- 2.- Conservas de dihueños en Salmuera con antimicrobiano.
- 3.- Dihueños Conservados en sal sin antimicrobiano.
- 4.- Dihueños Conservados en sal con antimicrobiano.
- 5.- Dihueños secos sin antimicrobiano.
- 6.- Dihueños secos con antimicrobiano.

Para los tratamientos 1 y 2 se prepararon frascos de 250 ml con 20 dihueños de calibre similar y 5 gr de Sal. Estos frascos fueron puestos a baño maría por 20 minutos y mantenidos en oscuridad hasta la evaluación. Para el tratamiento 2 los dihueños fueron previamente inmersos en el antimicrobiano seleccionado a inicio del trabajo, por 10 minutos, esto se hizo en todos los tratamientos con antimicrobiano.

Para los tratamientos 3 y 4 en frascos de vidrio para conservas de 250 ml se agregó sal en el fondo del frasco, luego una capa de dihueños de calibre similar y encima de ellos una nueva capa de dihueños y una nueva capa de sal y luego sellados con la tapa. Estos frascos fueron guardados a temperatura ambiente y oscuridad.

En el caso de los tratamientos por secado, los dihueños se dispusieron en estufa de secado, sobre papel secante, con una temperatura entre 30°C a 35°C, por 4 horas, luego se subió la temperatura a 50°C durante 5 horas, finalizando con una temperatura de 30°C durante 12 horas. Luego de evaluados todos los tratamientos, el material sometido a los diferentes tratamientos fue sellado al vacío y congeladas con sal a -20°C.

3.2.6 Evaluación de las características organolépticas de digueños sometidos a tratamientos de conservación y preservación. Con el propósito de evaluar las características organolépticas de los dihueños, posterior a los distintos procesos de conservación y preservación se realizó una encuesta de satisfacción en base a una tabla de datos (Cuadro 6), en la cual se plantearon un set de preguntas relacionadas con los productos. Esta encuesta se aplicó a las mismas personas en dos oportunidades, primero al mes de realizados los tratamientos y luego pasados 4 meses.

Para la aplicación de la encuesta se solicitó la participación de 3 personas relacionadas con el trabajo del laboratorio de Microbiología y que habitualmente consumiera dihueños durante la temporada de producción.

Cuadro 6. Información solicitada a los participantes de la mesa de degustación de los digueños de acuerdo al tratamiento de conservación y/o preservación al que fue sometido.

Nombre						
Fecha						
Tratamiento:	Sin antimicrobiano			Con antimicrobiano		
	Bueno	Malo	Regular	Bueno	Malo	Regular
Olor						
Sabor						
Color						
Apariencia						
Consistencia						
Observaciones:						

3.2.7. Aislamiento de *Pseudomonas fluorescens* y microorganismos asociados a los dihueños sometidos a los tratamientos de conservación y preservación. Para conocer la efectividad de los tratamientos de conservación y preservación realizados se realizó el aislamiento de los microorganismos que se encontraban presentes en las muestras de dihueños de cada uno de los tratamientos. Estos fueron caracterizados morfológicamente y por Tinción de Gram y comparados con los microorganismos aislados desde dihueños frescos. De estos microorganismos se seleccionaron los que se encontraron presentes en los dihueños después de ser sometidos a los diferentes tratamientos y se les realizó algunas pruebas bioquímicas y evaluación de su crecimiento en medios de cultivo con el propósito de caracterizarlos.

3.2.8 Identificación de *Pseudomonas fluorescens*. Morfología y pureza de los microorganismos asociados a *Cyttaria espinosae*. Los microorganismos aislados fueron en primer lugar sometidos a la Tinción de Gram para conocer su morfología y pureza. Esta tinción se fundamenta en la diferencia que existe en la membrana de las bacterias en cuanto al contenido de Péptidoglicano, dado que al momento de adicionar cristal violeta y lugol forman un complejo cristal violeta-yodo. La diferencia que se observa en la resistencia a la decoloración, permitirá diferenciar bacterias Gram negativas de bacterias Gram positivas. El protocolo para la tinción Gram se detalla a continuación.

1. Extender la muestra de bacteria sobre un portaobjeto y fijar el frotis a la llama de un mechero.
2. Cubrir el frotis con Violeta de Genciana por dos minutos.
3. Lavar cuidadosamente con agua destilada para eliminar el exceso de colorante.
4. Cubrir el frotis con lugol por 1 minuto.
5. Lavar con agua destilada.
6. Agregar alcohol acetona por algunos segundos.
7. Agregar safranina durante 30 segundos.
8. Se lava, se seca entre papel absorbente y se observa al microscopio.

Las pruebas bioquímicas realizadas para comprobar la presencia de *Pseudomonas fluorescens* fueron:

Prueba Indol, compuesto que se genera mediante la desaminación reductiva del triptófano y esta reacción es llevada a cabo por algunas bacterias que poseen las enzimas denominadas en su conjunto triptofanasas. Para esta prueba se inoculan las bacterias en los tubos con 5ml de Bacto Triptona (BTW) previamente autoclavado en tubos de ensayo. Incubar de 24 a 48 horas a 37°C. Añadir 1ml de reactivo de Kovacks, dejándolo caer por la pared interior del tubo. La reacción será positiva si se forma un anillo de color rosado en la parte superior del cultivo.

Prueba de Agar Citrato de Simmons, esta prueba permite determinar la utilización de citrato como única fuente de carbono para obtener energía en su metabolismo. Se sembraron en estrías las bacterias seleccionadas en los tubos con Agar Citrato inclinado, previamente autoclavado. Se incubaron de 24 a 48 horas a 37°C. Posterior al crecimiento, se observa un cambio de color en el medio si es que la bacteria utiliza el citrato como única fuente de carbono.

Prueba Ureasa, este medio de cultivo, formulado por Rustigian y Stuart, presenta bajo contenido de nutrientes y baja capacidad buffer. El extracto de levadura es la única fuente de carbono, nitrógeno, vitaminas y cofactores, y aporta los nutrientes esenciales para el desarrollo bacteriano. Las sales de fosfatos constituyen el sistema buffer, el rojo fenol es el indicador de pH y la urea es el sustrato de la enzima ureasa. Aquellas bacterias que poseen la enzima ureasa, pueden utilizar el nitrógeno proveniente de la urea, la hidrolizan, liberando amoníaco y dióxido de carbono. Estos productos metabólicos alcalinizan el medio, haciendo virar el indicador rojo fenol de amarillo al rojo. Sus uso, se recomienda para diferenciar *Proteus* spp. de otros géneros. Posterior a la preparación del medio de cultivo, se sembró un inóculo fresco de las bacterias, para luego incubarlas y observar la reacción a las 8, 12, 24, y 48 horas a una temperatura de 35 a 37°C.

Prueba TSI Agar, este es medio universalmente empleado para la diferenciación de enterobacterias, en base a la fermentación de glucosa, lactosa, sacarosa y a la producción de ácido sulfhídrico. En el medio de cultivo, el extracto de carne y la pluripectona, aportan los nutrientes adecuados para el desarrollo bacteriano. La lactosa, sacarosa, glucosa son los hidratos de carbono fermentables. El tiosulfato de sodio es el sustrato necesario para la producción de ácido sulfhídrico, el sulfato de hierro y amonio, es la fuente de iones Fe^{+3} , los cuales se combinan con el ácido sulfhídrico y producen sulfuro de hierro, de color negro. El rojo fenol es el indicador de pH, y el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. Por fermentación de azúcares, se producen ácidos, que se detectan por medio del indicador rojo de fenol, el cual vira al color amarillo en medio ácido. El tiosulfato de sodio se reduce a sulfuro de hidrógeno el que reacciona luego con una sal de hierro proporcionando el típico sulfuro de hierro de color negro. A partir de un cultivo puro se sembró en TSI en tubos de ensayo, con agar inclinado, picando en el fondo y extendiendo sobre la superficie del medio, se incubó durante 24 horas a $37^{\circ}C$. Esta prueba se hizo con el propósito de verificar la presencia de enterobacterias, entre las colonias aisladas del digueño.

Prueba para la Oxido Fermentación, las bacterias ocupan diferentes vías metabólicas para obtener sus nutrientes y la energía, casi todas las bacterias consumen algún tipo de carbohidrato generalmente el más utilizado por las bacterias es la glucosa, usan la vía oxidativa, fermentativa o ambas. La vía oxidativa utiliza oxígeno, un sinónimo de la vía aerobia. El metabolismo fermentativo no utiliza oxígeno, sinónimo de metabolismo anaerobio. El metabolismo oxidativo de la glucosa produce ácidos débiles, por lo tanto en la prueba bioquímica se utiliza de indicador el azul de bromotimol que tiene un pH menor respecto al rojo de fenol. En el tubo sin aceite: La producción de ácidos débiles reduciría el pH del medio esto será evidenciado gracias al indicador produciéndose una coloración amarilla en todo el tubo, aunque puede variar su intensidad. En el tubo con aceite: La fermentación de la glucosa produce ácidos fuertes respecto a los que produce la vía oxidativa, ejemplo de estos ácidos son el ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético, entre otros. El medio se acidifica y el vire del indicador da como resultado una coloración amarilla intensa en la totalidad del tubo. Para esta prueba se realizó el medio de cultivo de Hugh &

Leifson, en la que a partir de un cultivo puro se siembra sobre el medio las bacterias a analizar, se siembran dos tubos de cada microorganismo a analizar y a uno se le adicionó 1ml de aceite, para excluir el aceite, se incubó durante 24 a 48 horas a 37°C.

Prueba Catalasa, el peróxido de hidrógeno es el producto final del metabolismo oxidativo de carbohidratos, esta vía metabólica recibe el nombre de metabolismo aerobio-oxidativo. La acumulación del peróxido es muy tóxico por lo que la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas exceptuando a *Streptococcus* sp. producen una enzima llamada catalasa que degrada el peróxido de hidrógeno obteniendo agua y oxígeno gas. Para esta prueba, se tomaron las colonias con ayuda de una Pipeta Pasteur y se depositaron sobre un porta objeto, se añadió una gota de peróxido de hidrógeno al 3%. La aparición de burbujas indica que es una reacción positiva.

Prueba de Oxidasa, esta prueba está basada en la identificación de una enzima bacteriana llamada citocromo C oxidasa. Todas las bacterias aerobias obtienen su energía en forma de ATP a partir del proceso de respiración también llamado cadena respiratoria, este se lleva a cabo en la membrana celular bacteriana. En la respiración hay una secuencia de enzimas y transportadores que pasan los electrones desde sus sustratos hasta llegar al citocromo C, la enzima llamada citocromo C oxidasa le quita electrones al citocromo C, estos electrones son transferidos por la enzima al oxígeno siendo este el último aceptor de electrones en la cadena respiratoria, finalmente debido a que el oxígeno tiene un exceso de electrones puede atraer átomos de Hidrógeno formando dos posibles productos: Agua o peróxido de hidrógeno. Para la realización de este protocolo se tomaron las colonias y se extendieron encima de un papel filtro Whatman n°1, luego se deja caer una gota de reactivo de Kovacks sobre la colonia a determinar. En la reacción positiva el papel filtro se pone negro.

Las características de crecimiento de los microorganismos en diferentes medios de cultivo nos permite conocer algunos de sus requerimientos, con este propósito las bacterias seleccionadas se sembraron en estría algunos de los diferentes medios cultivo de uso en el laboratorio, incubadas a 28°C y evaluadas a las 24 y 48 horas. Los medios utilizados fueron Base Agar Sangre, medio útil

para el aislamiento y cultivo de microorganismos aerobios y anaerobios nutricionalmente exigentes así como para la observación de reacciones de hemólisis, Medio King B. Medio de cultivo para el aislamiento, la detección y la diferenciación de especies de *Pseudomonas* spp. en base a la producción de fluoresceína, Agar Manitol Levadura (YMA), este medio se usa como medio básico en el cultivo de bacterias de nodulación, como *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, los cuales forman colonias blancas o rosadas por absorber en forma débil el colorante, mientras que otras bacterias del suelo, *Agrobacterium*, forman colonias rojas por absorber fuertemente el colorante (Beck *et al.*, 1993) y Agar Burck, medio completo utilizado para el género *Azotobacter*.

4.- PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Aislamiento de *Pseudomonas fluorescens* y cepas bacterianas asociadas a *Cyttaria espinosae* y su inhibición con extractos naturales.

De las placas sembradas con trozos de dihueños frescos obtenidos en el Predio Rucamanque, se aislaron 22 cepas bacterianas las cuales fueron separadas de acuerdo a las diferencias observadas a simple vista en cuanto a su forma de crecimiento, elevación, borde y especialmente el color de las colonias. Además a cada una de estas cepas se les realizó la tinción de Gram con el propósito de conocer su forma y pureza. De esta manera se seleccionaron un total de 9 cepas bacterianas distintas entre sí, los cuales fueron identificados como R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8 y R9 respectivamente (Figura 5).

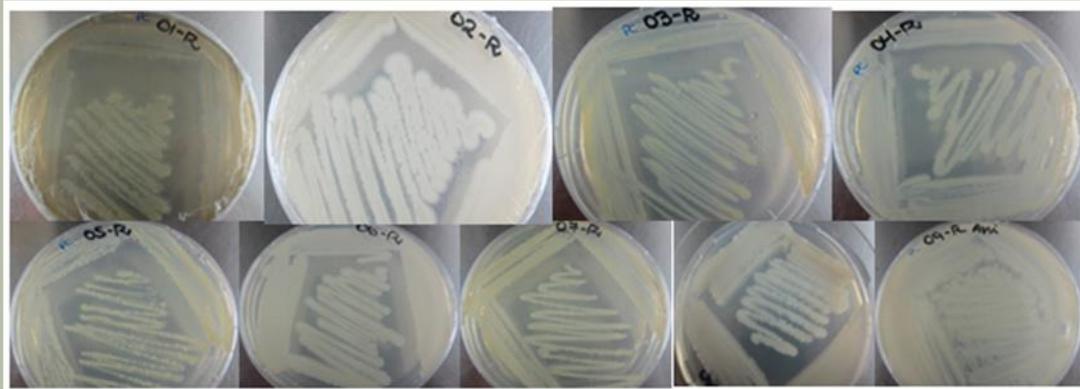


Figura 5. Microorganismos asociados a *Cyttaria espinosae* en medio de cultivo Plate Count.

Aun cuando es difícil reconocer los diferentes géneros bacterianos a simple vista, hay algunas que pueden ser fácilmente reconocibles por la producción de pigmentos fluorescentes como es el caso de *Pseudomonas fluorescens*, bacilo Gram negativo que se ha observado causando manchas y pudrición en champiñones (datos no publicados), sin embargo, para corroborar esto se sembraron todas las cepas aisladas en medio de cultivo King B, que tiene la propiedad de permitir la producción de los pigmentos fluorescentes, los cuales pueden ser observados fácilmente bajo la

luz UV, y efectivamente se encontró una cepa de *Ps. fluorescens*, la cual se clasificó como R01. (Cuadro 7).

Cuadro 7. Resultados pruebas bioquímicas realizadas a las cepas bacterianas aisladas de *Cyttaria espinosae*.

Pruebas Bioquímicas	Cepas bacterianas asociados al dihueñe													
	R01	R02	R03	R04	R05	R06	R07	R08	R09	R10	R11	R12	R13	R14
Gram (Bacilos)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Indol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-
Ureasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxido-fermentación	O	F	O	O	F	F	F	F	O	F	O	O	F	O

La presencia de esta bacteria nos permite asumir que al igual como sucede en los champiñones, pudiera estar afectando la durabilidad del producto, razón por la cual se buscó principalmente la inhibición de esta bacteria. Lo cual no quiere decir que el resto de bacterias asociadas al dihueñe, no causen algún tipo de problema, lo cual debe ser estudiado en investigaciones futuras. Otro aspecto importante es el hecho de que no se obtuvo la presencia de hongos afectando al dihueñe, probablemente también por acción de las bacterias que se encontraban presentes y que pudieran estar realizando algún tipo de control biológico.

Las 9 cepas seleccionadas fueron sometidas a una prueba de inhibición utilizando algunos extractos naturales que han sido ensayados en el laboratorio y que han mostrado una buena actividad antimicrobiana frente a diferentes cepas fitopatógenas incluyendo a *Ps. fluorescens* (datos no publicados).

Si bien todos los extractos utilizados presentaron en mayor o menor medida cierto grado de inhibición frente a alguna de las cepas ensayadas, el extracto natural P01, fue el que presentó una mayor inhibición, incluso superiores al control positivo Gentamicina al 0,5% (2mg/ml) y además con efecto sobre 8 de las 9 cepas bacterianas obtenidas (Cuadro 8), siendo resistente solo la cepa clasificada como R05.

Cuadro 8. Promedio de inhibición de las 9 cepas bacterianas asociadas a *Cyttaria espinosae* por acción de los extractos naturales con actividad antimicrobiana conocida.

Extracto Vegetal	Promedios de halos de inhibición (mm)								
	Bacterias asociadas a <i>C. espinosae</i>								
	R01	R02	R03	R04	R05	R06	R07	R08	R09
M02	0,00	0,70	0,00	0,40	0,50	0,50	0,00	0,00	0,30
N03	0,40	0,00	0,50	0,20	0,30	0,00	0,30	0,00	0,00
P01	1,00	0,90	1,00	0,70	0,00	0,80	0,80	0,90	0,90
R04	0,00	0,50	0,30	0,40	0,00	0,60	0,00	0,00	0,00
Z03	0,40	0,00	0,00	0,80	0,20	0,40	0,00	0,40	0,00
Gentamicina 0,5%	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50

Debido a los buenos resultados obtenidos en la inhibición de los microorganismos presentes en el dihueño por acción del extracto P01, éste fue utilizado en cada uno de los ensayos que se requería aplicar algún antimicrobiano. Estos resultados coinciden con investigaciones realizadas en el CEBEM y que dan cuenta de la acción bactericida de este extracto (Concha, 2012).

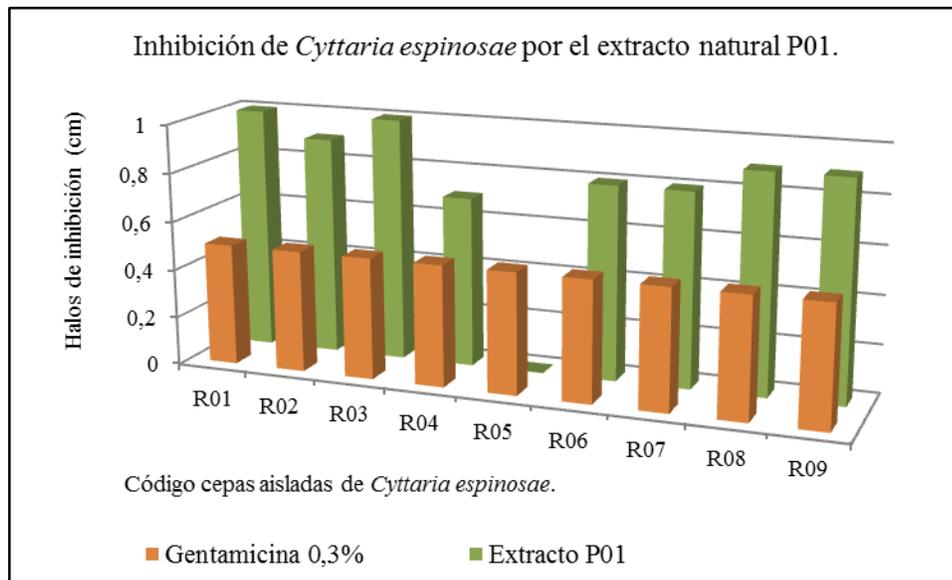


Figura 6. Promedios de inhibición del extracto natural P01, sobre las capas bacterianas aisladas de digueño y comparadas con el control positivo Gentamicina al 0,5% 2mg/ml.

4.1.1 Características organolépticas de los digueños en conservas y preservados y tratados con y sin antimicrobiano. La importancia de conocer la presencia de los microorganismos asociados al dihueño, se basa en la facilidad con que el producto pierde sus características organolépticas, afectando la posibilidad de mantener dihueños frescos por periodo de tiempo prolongados, quizás por lo blando de su textura y la presencia de una baba transparente, que corresponde a polisacáridos. A pesar de lo apetecido que es este hongo en la época de producción solo permite comerlo en ensaladas y no se puede guardar, sólo se puede refrigerar aunque por no más de dos días. Últimamente en base a incentivar el consumo de comida tradicional se ha visto la preparación de algunos platos en base a dihueños, sin embargo esto trae consigo la necesidad de preservarlo.²

² Diario El espejo de Malleco 2011. Tercera versión del Festival del digueño reunió a más de mil personas.

Dado que uno de los objetivos de este trabajo de investigación fue evaluar algunas formas de conservación de los dihueños, manteniendo sus características organolépticas y que a su vez prolongue el tiempo de consumo de dicho hongo, se planteó eliminar los microorganismos presentes en el dihueño para evaluar la influencia que estos tienen en la conservación y calidad del dihueño.

Los resultados de la evaluación organoléptica y degustación de los dihueños sometidos a los tres tratamientos planteados, es decir en conserva, en sal y secos y cada uno de ellos con y sin antimicrobianos, se muestran en las Figuras 7 y 8. Es importante señalar que también es necesario considerar al momento de seleccionar los dihueños para realizar los procesos de conservación o preservación, que el estadio de desarrollo en el cual se encuentre el dihueño muestre que los hongos tienen sus apotecios cerrados ya que son los que mejor se conservan.

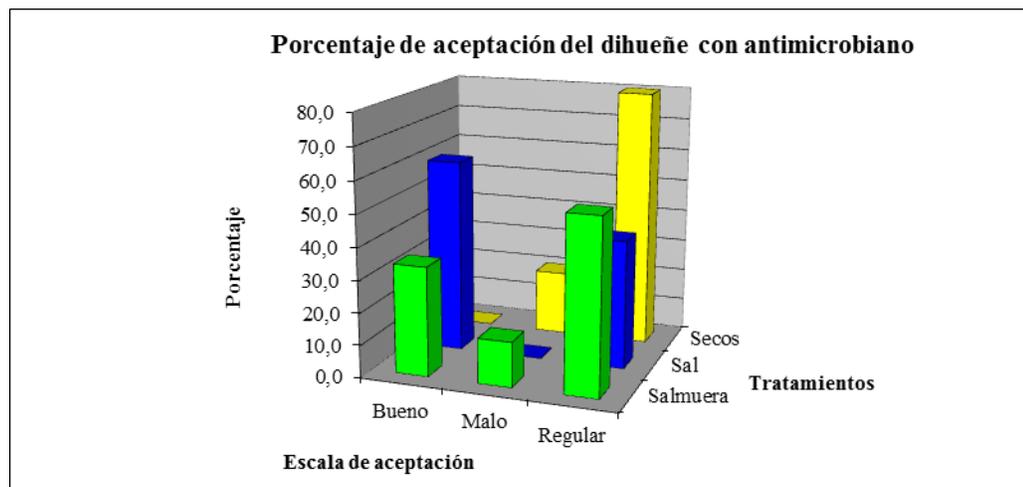


Figura 7. Representación de los porcentajes de aceptación de los dihueños tratados con antimicrobiano y sometidos a los tratamientos de conservación y preservación.

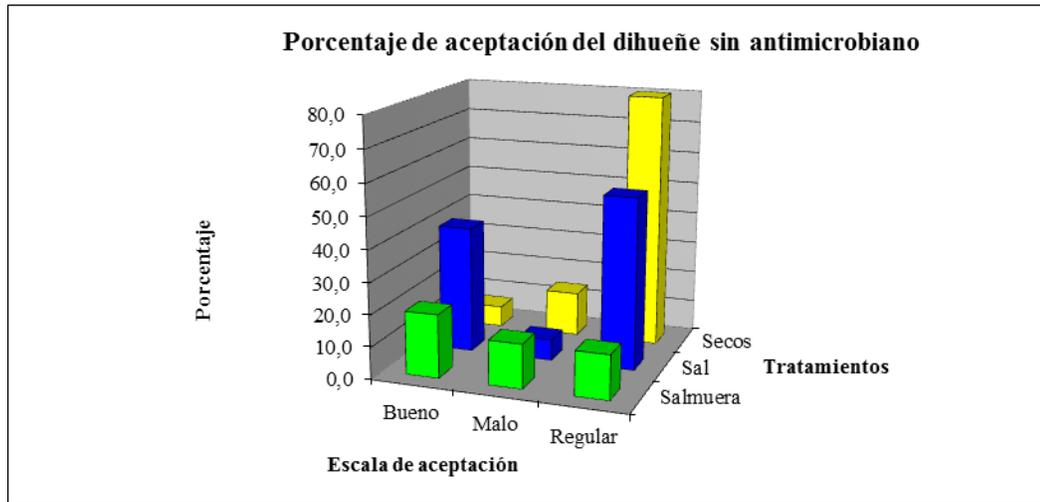


Figura 8. Representación de los porcentajes de aceptación de los dihueñes sin antimicrobiano y sometidos a los tratamientos de conservación y preservación.

Es importante resaltar que los resultados de la aceptación de los dihueñes en conservas, sal y secos son mayores cuando han sido tratados con anterioridad con el antimicrobiano P01, observándose que en general los dihueñes tuvieron una aceptación de regular a bueno.

Para el caso de los tratados con antimicrobiano los mayores porcentajes de aceptación están en la categoría de regulares y en estos casos las observaciones de los integrantes del panel de degustación señalaron que los que estaban en conservas quedaban más ligosos, perdiendo la textura firme natural del hongo, lo que les daba una consistencia no agradable a diferencia de lo que sucedió con los que se mantuvieron en sal, los cuales tenían una consistencia muy natural, el único factor que influyó en que bajara la aceptación, fue la alta concentración de sal que se adhiere a las paredes y es incorporada al dihueñe, siendo necesario lavarlos para degustarlos y aun así eran salados, sin embargo, si estos dihueñes se utilizaran para hacer una ensalada o una preparación caliente, simplemente con agregar los condimentos acostumbrados y no agregar sal, el plato quedaría a satisfacción de los consumidores habituales de dihueñes. Para el caso de los dihueñes secos, los resultados muestran una buena aceptación sin embargo, es necesario continuar realizando pruebas ya que los dihueñes quedaron demasiados duros con el tratamiento térmico aplicado en este trabajo.

Por otra parte, los dihueños sometidos a los diferentes tratamientos pero sin antimicrobiano tuvieron también una aceptación de regular a bueno pero, los integrantes del panel de degustación señalaban que organolépticamente eran de peor calidad que los tratados con el antimicrobiano.

Como una forma de comprobar si los diferentes tratamientos de conservación y preservación y sobre todo el uso de antimicrobiano habían eliminado los microorganismos asociados al dihueño y que fueron obtenidos en fresco, se realizó la siembra en medio de Cultivo Plate Count de trozos de dihueños tratados de los cuales se obtuvieron un total de 5 microorganismos visualmente distintos entre sí, los que fueron rotulados como: R10, R11, R12, R13 y R14 respectivamente (Figura 9). Estos microorganismos al igual que los anteriores fueron aislados en nuevas placas, utilizando la siembra en estría. Los resultados indican que los tratamientos utilizados no son suficientes para eliminar dichos microorganismos, sin embargo, no se obtuvo *Ps. fluorescens* en estos aislamientos, lo cual es importante, dado que es uno de los microorganismos que causan cambios organolépticos en otros hongos como son los champiñones, los cuales sufren un rápido deterioro por efecto de esta bacteria provocándoles manchas café, que luego se transforman en pudriciones.

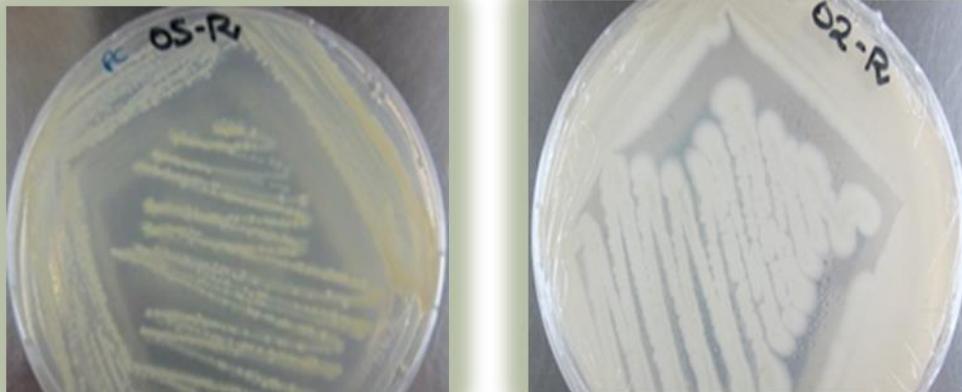


Figura 9. Microorganismos asociados a *Cyttaria espinosae* luego de ser sometidos a diferentes procesos de conservación y preservación.

4.2 Actividad antimicrobiana de extractos frescos de *Cyttaria espinosae* frente a las bacterias fitopatógenas *Erwinia caratovora* y *Pseudomonas syringae*.

Los extractos de dihueño se prepararon de acuerdo a la metodología planteada, obteniéndose tres tipos de extractos, vale decir, alcohólico, acuoso y puro, los cuales fueron ensayados frente a las bacterias fitopatógenas *Erwinia caratovora* y *Pseudomonas syringae* (Figura 10 y 11) y los hongos *Botrytis cinérea* y *Fusarium* sp. (Cuadro 9).

En la Figura 10 y 11 se muestran los resultados de dos evaluaciones, la primera realizada al tiempo cero, es decir con el extracto fresco, realizado al momento de cosechar los dihueños y una segunda evaluación efectuada 3 meses después, donde el extracto se mantuvo a -20°C .

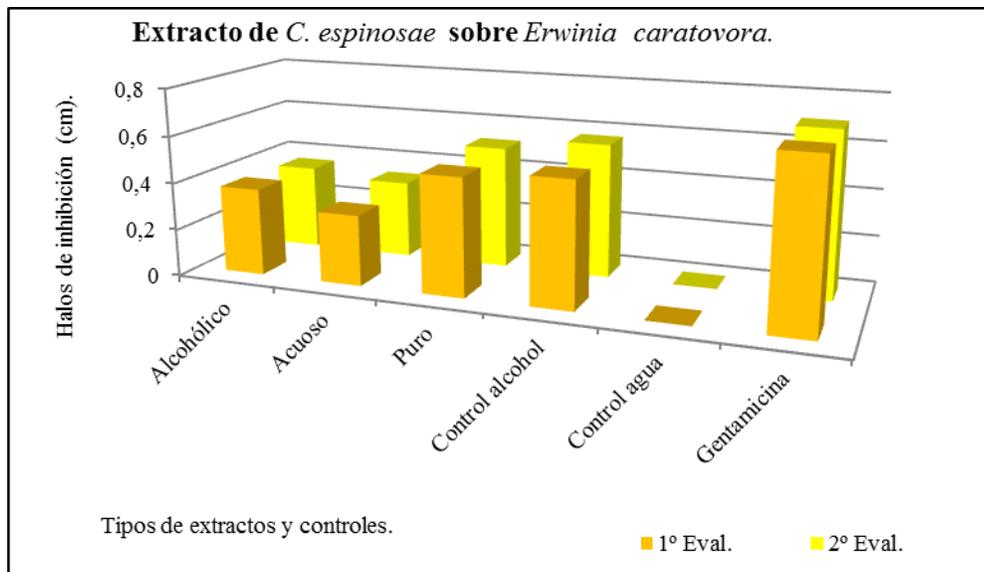


Figura 10. Promedios inhibición de *Erwinia caratovora* por acción de los extractos de *Cyttaria espinosae* y evaluados al tiempo cero y luego de tres meses de mantener el extracto a -20°C .

Se observa en primer lugar que el efecto bactericida mostrado por los extractos de dihueño frente a *Erwinia caratovora* (Figura 10) permanece en el tiempo, aun cuando dicho efecto es inferior al efecto inhibitor que muestra la Gentamicina, es un resultado importante, debido a que el antibiótico Gentamicina o cualquier otro, no es factible de utilizar en huertos o plantaciones

donde esté la presencia de esta bacteria. Se observa además, que el efecto del extracto puro es mejor que el alcohólico y el acuoso, en este caso no se presenta un efecto sinérgico, es importante señalar que los datos mostrados corresponden exactamente al valor de cada uno de los extractos, se ha restado el efecto inhibitorio mostrado por el alcohol.

Como se ha señalado, la mayor inhibición para el caso de *E. caratovora* se produce con la aplicación del extracto puro de dihueñe, a diferencia de lo que sucede con *Ps. syringae* sobre el cual los extractos de dihueñe en cualquiera de sus formulaciones tienen un comportamiento similar (Figura 11), siendo la respuesta bastante menor que sobre *E. caratovora*.

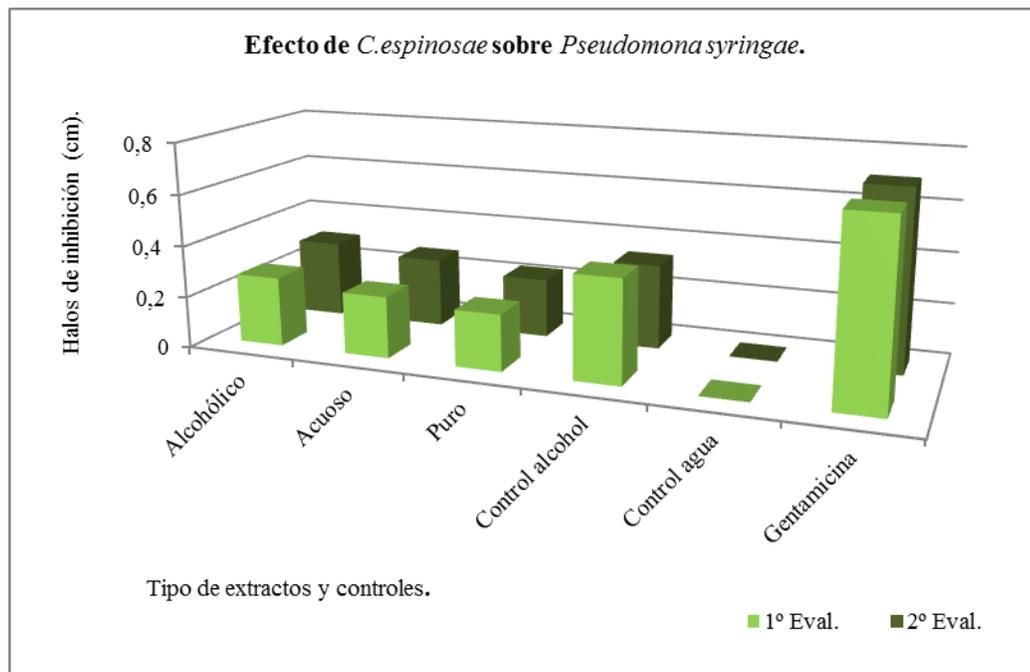


Figura 11. Promedios de inhibición de *Pseudomonas syringae* por acción de los extractos de *Cyttaria espinosae* y evaluados al tiempo cero y luego de tres meses de mantener el extracto a -20°C .

Los valores de efectividad representados en porcentajes en el Cuadro 9, nos muestra que para *E. caratovora* los valores están entre el 45,7 y el 72,9% con respecto al control positivo Gentamicina, sin embargo para *Ps. syringae*, los valores son menores al 50% de efectividad fluctuando entre el 31,4 y el 41,4% lo que nos indica que no son valores importante, aun cuando

es factible pensar que en forma preventiva pudieran ser efectivo, pensando en disminuir la aplicación de productos químicos en beneficio de las plantas, los frutos, el medio ambiente y también de la salud humana, por otra parte debiera también evaluarse la aplicación reiterada lo que pudiera dar como resultado un comportamiento acumulativo, el cual en forma preventiva podría ser aplicado sin problemas.

Cuadro 9. Promedios de inhibición del desarrollo de dos bacterias fitopatógenas por acción de los extractos de *Cyttaria espinosae*.

Bacterias Fitopatógenas	Tipo de extracto			Controles		
	Alcohólico	Acuoso	Puro	alcohol	agua	Gentamicina
<i>E. caratovora</i>	0,37	0,32	0,51	0,55	0,0	0,7
<i>Ps. syringae</i>	0,29	0,26	0,22	0,37	0,0	0,7
	Porcentajes (%)					
<i>E. caratovora</i>	52.9	45.7	72.9			100 %
<i>Ps. syringae</i>	41.4	37.1	31.4			

La acción bactericida mostrada en mayor o menor porcentaje por los extractos de dihueño pudieran estar relacionados con la característica conocida de que los hongos son ricos en compuestos fenólicos (ácidos fenólicos y flavonoides), carotenoides, tocoferoles y ácido ascórbico. Resultados preliminares obtenidos por algunos investigadores muestran que algunos flavonoides tienen actividad antimicrobiana (Tereschuk *et al.*, 1997), lo cual implica continuar investigando los factores involucrados y realizar la separación de otros compuestos con actividad antimicrobiana con el propósito de conocer el o los posibles mecanismos con que los flavonoides actúan como antimicrobianos (Rauha, 2000).

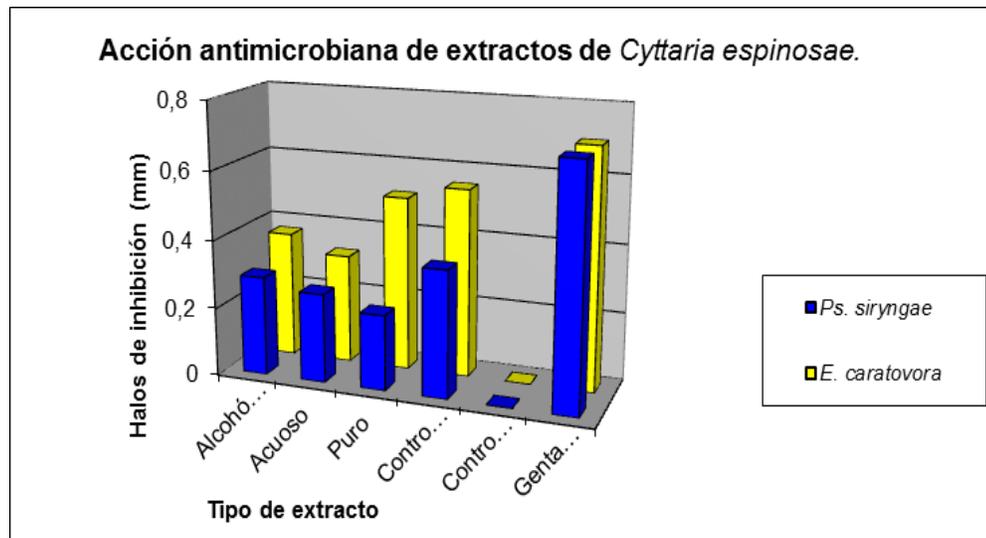


Figura 12. Comparación de Promedios de inhibición del desarrollo de *E. caratovora* y *Ps. silyngae* por acción de los extractos de *Cyttaria espinosae*.

En diversos hongos comestibles estudiados, se han determinado concentraciones de polifenoles totales en un rango de 2,7 a 26,0 mg/g, (Elmastas *et al.*, 2007; Barros *et al.*, 2007 y 2008). Para el caso de dihueñe (*Cyttaria espinosae*) no se registran reportes científicos que establezcan los niveles de componentes polifenólicos sin embargo, la presencia de estos compuestos permite asumir que si tendrían actividad antimicrobiana, además de la presencia de un gran contenido de polisacáridos, de los cuales se tiene referencia de su acción antimicrobiana. La importancia de los polisacáridos provenientes de extractos de hongos comestibles destacó en el campo de los alimentos funcionales. Parcialmente, las setas cultivadas del género *Pleurotus* son interesantes debido a los β -glucanos los cuales demuestran una gran inmunomodulación, además de propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y analgésicas (Bobek y Galbavy, 2001). Siendo los flavonoides los compuestos más importantes en dicha actividad.

De acuerdo a resultados preliminares obtenidos en el proyecto Fondef CA12i10134 el contenido de polifenoles totales en mg AGE/100 g de dihueñe fresco de Rucamanque es de 51,0909, lo cual muestra que entre estos compuesto pudieran haber algunos que tengan actividad antimicrobiana, así como es posible que esta actividad este asociada a la presencia de polisacáridos, los cuales se presentan en gran cantidad.

4.3 Actividad antimicrobiana de extractos frescos de *Cyttaria espinosae* frente a los hongos fitopatógenos *Botrytis cinerea* y *Fusarium sp.*

La actividad antimicrobiana ejercida por los diferentes extractos de dihueñe sobre los hongos fitopatógenos en estudio se muestran en las Figuras 13 y 14, en los cuales se observa que la acción fungicida es efectiva sin ser mayor que la acción del fungicida Pangermex, que corresponde a un fungicida natural utilizado para el control de *Botrytis cinérea* y que fue utilizado como control, luego de probar también con Polyben y Anfotericina B, al tener todos la misma respuesta frente a ambos fitopatógenos se decidió utilizar Pargermex.

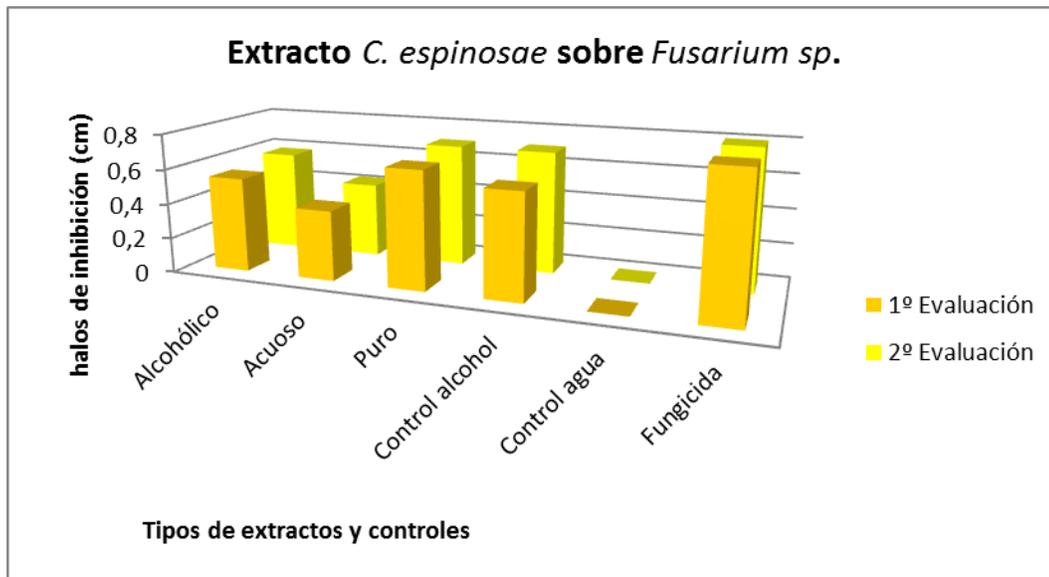


Figura 13. Promedios de inhibición del desarrollo de *Fusarium sp* por acción de los extractos de *Cyttaria espinosae* al tiempo cero y luego de 8 meses de mantener el extracto a -20°C .

Aun cuando el efecto fungicida no es comparable con el ejercido por el fungicida, es necesario realizar el análisis de permanencia del efecto del extracto de dihueñe en cada una de sus formulaciones, ya que en el Cuadro 10 se muestran dos evaluaciones que corresponden al tiempo cero, es decir realizando el ensayo al momento de hacer el extracto inmediatamente de

cosechados los dihueños, y luego a los 8 meses de conservados los extractos a -20°C y observamos que el comportamiento no ha variado, es más se puede señalar que hay una mínima tendencia a ser más efectivos. Estos datos nos permiten señalar que sería factible utilizar estos productos en forma preventiva.

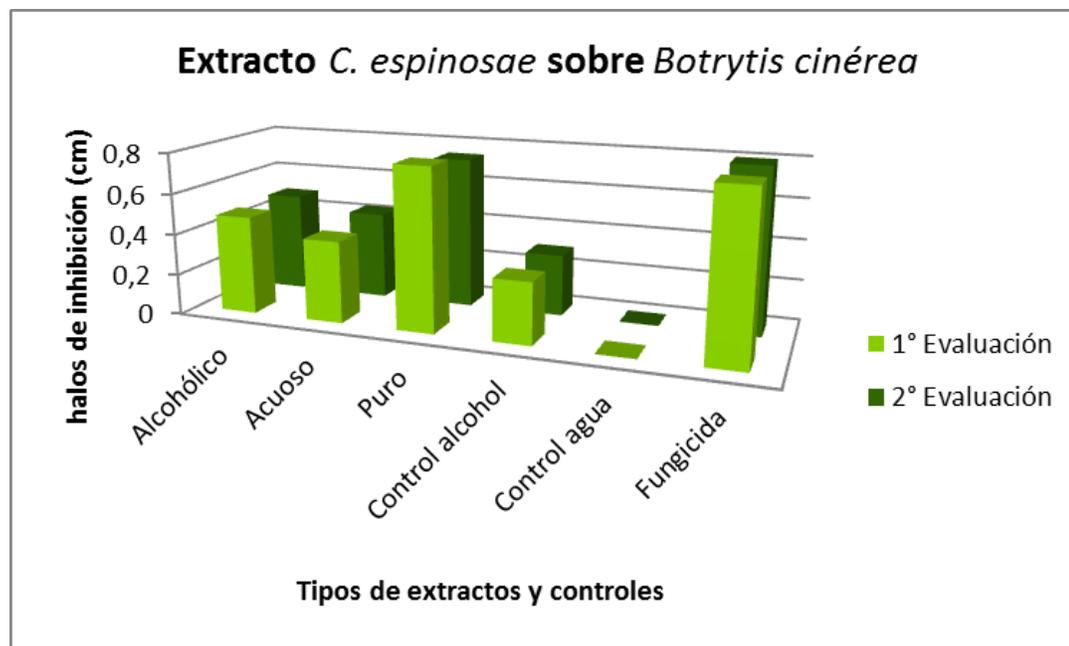


Figura 14. Promedios de inhibición de *Botrytis cinerea* por acción de los extractos frescos de *Cytaria espinosae* y evaluados al tiempo cero y luego de ocho meses de mantener el extracto a -20°C .

Cuadro 10. Promedios de inhibición del desarrollo de *Fusarium* sp. y *Botrytis cinerea* por acción de los extractos de *Cyttaria espinosae* al tiempo cero y luego de 8 meses de mantener el extracto a -20°C .

Hongos Fitopatógenos	Tipo de extracto	Halo de inhibición (mm)	
		1° Evaluación	2° Evaluación
<i>Fusarium</i> sp.	Alcohólico	0,54	0,58
	Acuoso	0,40	0,43
	Puro	0,67	0,70
	Control alcohol	0,60	0,70
	Control agua	0,0	0,0
	Fungicida	10,0	10,0
<i>Botrytis</i> sp. pv. Frutilla	Alcohólico	0,48	0,49
	Acuoso	0,4	0,43
	Puro	0,79	0,74
	Control alcohol	0,3	0,3
	Control agua	0,0	0,0
	Fungicida	10,0	10,0

De acuerdo a lo que se registra en el Cuadro 10, los tres extractos poseen un porcentaje de variación positiva, el extracto puro es el que tiene un mejor efecto antimicrobiano con un 6,4% de acción respecto del 100% del fungicida. Es importante señalar que estos resultados son para los patovares ensayados en este estudio, cualquier otro patovar debe ser sometido a la evaluación antimicrobiana ya que este varía dependiendo de la cepa que se trate, es importante considerar que la actividad antimicrobiana difiere entre géneros y a su vez entre patovares (Saucedo y Gavilarez, 2005).

Cuadro 11. Promedios y Porcentajes de inhibición del desarrollo de los hongos *Fusarium* sp. y *Botrytis cinerea* por acción de los extractos de *Cyttaria espinosae* en las formulaciones alcohólicas, acuosos y puros.

Hongos Fitopatógenas	Tipo de extracto			Controles		
	Alcohólico	Acuoso	Puro	alcohol	agua	Fungicida
<i>Fusarium</i> sp.	0,56	0,42	0,64	0,65	0,0	1,0
<i>Botrytis</i> sp.	0,49	0,42	0,77	0,3	0,0	1,0
	Porcentaje (%)					
<i>Fusarium</i> sp.	5,6	4,2	6,4			100%
<i>Botrytis</i> sp.	4,9	4,2	7,7			

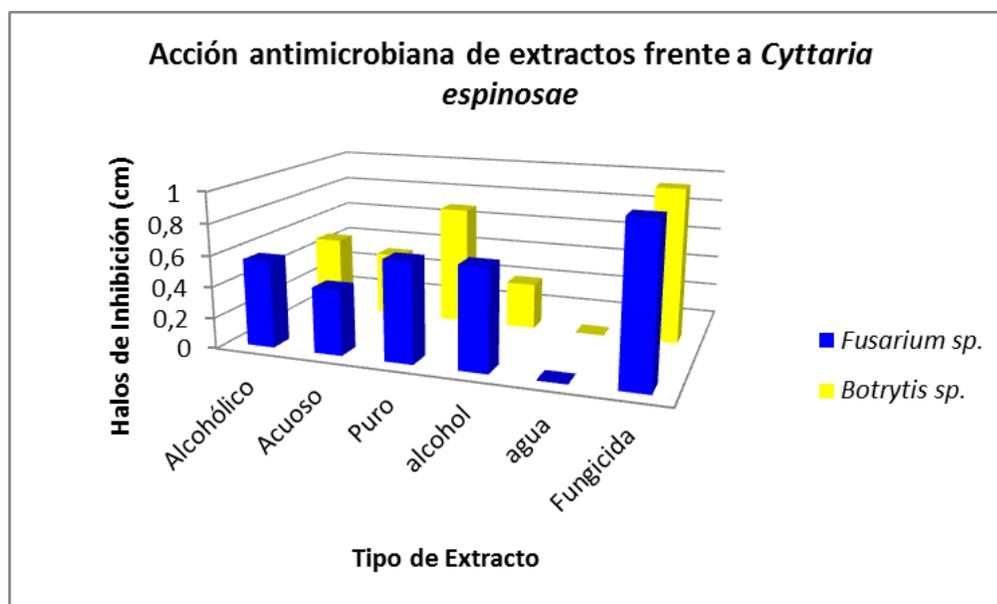


Figura 15. Comparación de Promedios de inhibición del desarrollo de *Fuarium* sp y *Botrytis* sp. por acción de los extractos de *Cyttaria espinosae*.

De acuerdo a la información existente en otras investigaciones donde se realizan protocolos similares a los desarrollados en esta investigación existe discrepancia en la manipulación del material vegetal a utilizar, ya que en este caso fue difícil debido a la poca información existente sobre la capacidad antimicrobiana de *Cyttaria espinosae*, ya que en otros casos elaboran protocolos de desinfección que constan de etapas como: lavado con agua potable, separación de impurezas, lavados con agua destilada estéril y Twen 20, también con hipoclorito (Wallach, 2010). De acuerdo a la morfofisiología del digueño resulta difícil la elaboración de un protocolo de desinfección eficiente, del cual se tenga certeza de que no esté interfiriendo con la capacidad antimicrobiana que pudiese tener.

De acuerdo a la forma de preparación de los extractos a utilizar posteriormente en los ensayos de inhibición, existen referencias que detallan procedimientos como agregar a los extractos naturales sulfato de sodio, sustancia que ayuda a la separación de la humedad, posteriormente lo obtenido en base a la separación se somete a un rotavapor a una temperatura de 40°C por aproximadamente 30 minutos (Wallach, 2010). Este instrumento es de vital importancia para la evaporación de los solventes utilizados, como alcohol, en el caso del extracto alcohólico. Disminuyendo al máximo las variables que pudiesen influir en la característica que se quiere estudiar. Llevando este enunciado a los protocolos utilizados dentro de esta investigación se observa la diferencia, que pudiese existir entre los resultados obtenidos entre el primer y segundo ensayo, en ambos casos de los fitopatógenos estudiados, utilizando los mismos extractos. En otros casos la utilización de extractos en base a acetona y hexano muestran resultados inhibitorios ya que al probar ambos solventes por separado, sobre los cultivos bacterianos y fúngicos no se observan resultados de inhibición (Wallach, 2010). Lo que podría ser una buena alternativa en la preparación de extractos en un posterior ensayo de investigación.

Para la preparación del extracto acuoso existe la posibilidad de que se contamine más fácilmente por la presencia de microorganismos en el ambiente. En estudios recientes se llevan a cabo extracciones, teniendo en cuenta la esterilización de los extractos utilizados mediante el método de filtración por membrana, llevando el procedimiento a cabo en una cámara de flujo laminar para así evitar todo tipo de contaminación. Los extractos acuosos del material vegetal a

estudiar se deben analizar utilizando el método de Dilución- Neutralización, simultáneamente se deben realizar pruebas de ausencia de microorganismos aerobios y ausencia de mohos y levaduras para determinar si los extractos obtenidos están contaminados (Requeno, 2012).

En esta investigación, a diferencia de los estudios realizados anteriormente, el principal objetivo planteado fue el aislar los microorganismos asociados a *Cyttaria espinosae* antes y después de los procesos de conservación y preservación y evaluar la capacidad antimicrobiana que estos microorganismos asociados pudiesen presentar, frente a los fitopatógenos como *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae*, *Fusarium* sp. y *Botrytis* sp. ya que al no contar con investigaciones sustanciales relacionadas con este patógeno del género *Nothofagus*, es necesario contar con cierta información que nos indique cuales son las características que hacen que *Cyttaria espinosae* posea capacidades antimicrobianas.

4.4 Evaluación de actividad antimicrobiana de extractos de dihueño sometidos a los procesos de conservación y preservación.

Con el propósito de conocer si la actividad antimicrobiana de los extractos de dihueño frescos observada frente a las bacterias fitopatógenas utilizadas en este estudio se mantenía luego de ser sometidos a los procesos de conservación y preservación, se realizó la preparación de nuevos extractos de dihueños pero esta vez se utilizó los que fueron sometidos a los tratamientos de conservación y/o preservación por espacio de 6 meses en promedio.

Los resultados obtenidos indican que la acción bactericida ejercida por los dihueños en fresco se pierde una vez que son tratados (Figura 16), lo cual para el caso de las conservas pudiera estar relacionado con la temperatura, dado que estos se llevan a 100°C por 20 minutos, tiempo suficiente para matar bacterias aerobias no esporuladas, que sería el caso del 100% de las bacterias aisladas ya que ninguno presentó esporas (Wallach *et al.*, 2010). También en el caso de la preservación en sal la actividad antimicrobiana fue inhibida, debido a que es conocida la

actividad antimicrobiana que ejerce la sal, aun cuando de acuerdo a las pruebas realizadas en este estudio (Cuadro 12), algunas de las bacterias presentes resisten algunas concentraciones de sal, sin embargo los tratamientos de preservación son en sal pura la cual posee una alta concentración de cloro y sodio (60/40), además de otros componentes como yodo, que también tienen actividad antimicrobiana (Gómez, 2002). Para el caso de los dihueños secos, este proceso ha eliminado las bacterias presentes, probablemente por la deshidratación prolongada a la cual fueron sometidos.

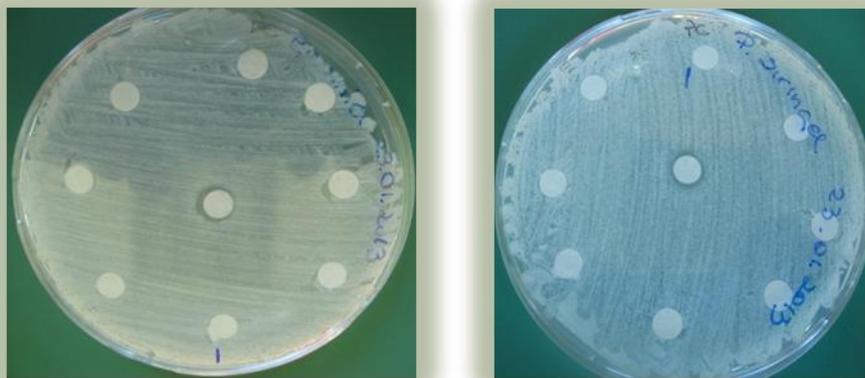


Figura 16. Resultados antibiograma para *Erwinia corotovora* y *Pseudomonas syringae*.

Cuadro 12. Tolerancia a diferentes concentraciones de sal de las cepas bacterianas aisladas de *Cyttaria espinosae*.

Pruebas Bioquímicas	Cepas bacterianas asociados al dihueño													
	R01	R02	R03	R04	R05	R06	R07	R08	R09	R10	R11	R12	R13	R14
Conc. de Sal 1%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Conc. de Sal 3%	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Conc. de Sal 5%	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Conc. de Sal 7%	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+
Conc. de Sal 10%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Para el caso de los hongos fitopatógenos *Fusarium* sp. y *Botrytis* sp., no se evidenció acción con los extractos en fresco y tampoco se dio con los extractos de dihueños en conservas o preservados (Figura 17).



Figura 17. Resultados antibiograma para *Fusarium* sp. y *Botrytis* sp.

Los resultados obtenidos en esta investigación preliminar nos indican que es necesario continuar realizando diferentes ensayos para obtener un protocolo que permita en primer lugar conservar los dihueños en buenas condiciones organolépticas, lo cual favorecería a los consumidores de estos productos. Por otra parte, es necesario aumentar la información respecto a las características de este hongo incorporando la comparación con dihueños obtenidos en otros sectores, de manera de conocer si efectivamente todos los dihueños tienen actividad antimicrobiana.

5. CONCLUSIONES

La actividad antimicrobiana, evaluada como inhibición del desarrollo de las bacterias fitopatógenas *Pseudomonas syringae* y *Erwinia carotovora*, fue más efectivo cuando se aplicó el extracto puro de *Cyttaria espinosae*, con inhibición cercana a la observada por el control positivo Gentamicina. El efecto antimicrobiano del extracto permanece en el tiempo.

La actividad antimicrobiana, ejercida por los extractos de dihueño frente a los hongos fitopatógenos *Botrytis cinérea* y *Fusarium* sp. fue más efectiva cuando se utilizó el extracto puro de dihueño.

Los dihueños conservados en sal fueron los que tuvieron los mayores porcentajes de aceptación, lográndose conservar productos que mantuvieron sus características organolépticas por el tiempo que duró el ensayo.

La aplicación del antimicrobiano natural P01 antes de realizar los procesos de conservación y preservación de los dihueños fue efectivo, otorgándole a los productos mejores características organolépticas, como color, textura y olor.

Se aislaron un total de 14 cepas bacterianas asociadas a *Cyttaria espinosae*, de las cuales 9 fueron aisladas desde dihueños en fresco y entre las cuales se encontraba *Pseudomonas fluorescens* y 5 aislados posterior a los procesos de conservación preservación, donde no se encontró *Ps. fluorescens*.

6. RESÚMEN

Los Hongos silvestres comestibles son un recurso forestal no maderable que ha sido utilizado desde épocas prehispánicas en el mundo. Chile constituye un importante reservorio de dichos hongos a nivel mundial. Existen también especies de hongos parásitos consumidos en nuestro país, este es el caso de *Cyttaria espinosae*, parásito de *Nothofagus obliqua*, este hongos conocido comúnmente como “digueño o dihueño” es el mayormente consumido y comercializado, dentro de los hongos parásitos existentes en nuestro país. Aunque es uno de los hongos más conocido y consumido existe muy poca información con respecto a este, ya que no hay estudios analíticos de las condiciones que favorecen a la infección o la producción del cuerpo fructífero, o que incide en la duración del ciclo de la enfermedad. El uso de herramientas biotecnológicas para el estudio de *Cyttaria espinosae* es uno de los propósitos de esta investigación, ya que se propuso evaluar métodos que permitan conservar y preservar este hongo comestible, ya que su principal limitación es la estacionalidad de producción la que se da sólo entre Septiembre Octubre. Por lo que resultó indispensable encontrar algún proceso que ayude a su conservación y preservación. Junto con lo anterior se propuso conocer los microorganismos asociados al dihueño, su influencia en los procesos de conservación y formas de inhibición, además se evaluó la capacidad antimicrobiana del dihueño frente a fitopatógenos de interés como *Fusarium* sp. *Botrytis* sp. *Pseudomonas syringae*, y *Erwinia carotovora*, mediante la preparación de extractos alcohólicos, acuosos y puros.

Los resultados obtenidos muestran que la mejor forma de conservar los hongos *Cyttaria espinosae* es en sal, tanto a temperatura ambiente como a -20°C . La capacidad antimicrobiana se confirma, ya que los extractos preparados presentaron inhibición frente a los fitopatógenos evaluados. Si bien los extractos preparados posteriormente a los procesos de conservación y preservación no registran capacidad inhibitoria, se presume entonces que la actividad antimicrobiana de *Cyttaria espinosae* está dada por alguna otra sustancia o metabolito que presenta este hongo en fresco.

7. SUMMARY

Wild edible fungi are non-timber forest resources, which has been used since pre-Hispanic times in the world. Chile is an important reservoir of these fungi worldwide. There are also species of parasitic fungi consumed in our country, this is the case *Cyttaria espinosae*, parasite of *Nothofagus obliqua*, this fungus commonly known as "digueñe" is the mostly consumed and marketed within the fungal parasites in our country. Although, being the best known and consumed, there is very little information on this, as there are no analytical studies of the conditions conducive to infection or production of disgust, or that affects the duration of the disease cycle. The use of biotechnological tools for the study of *Cyttaria espinosae* is the purpose of the research, because this research seeks to find the method adapting to conserve and preserve this edible mushroom, since the main limitation with this is that the studies made are limited only to the time of its appearance in September and October. So it was essential to find a process that helps its conservation and preservation. Then required to evaluate the antimicrobial activity against pathogens of interest as *Fusarium* sp. *Botrytis* sp. *Pseudomonas syringae*, and *Erwinia carotovora* by preparation alcoholic extracts, aqueous and pure. Also isolated microorganisms associated with this parasite.

The results show that the best conservation is *Cyttaria espinosae* salt is performed at both room temperature and at -20°C . The state of development of the "digueñe" is important use them to preserve them, since fungi are closed apothecia have their work best when conserved. Based on its ability microbial this is confirmed, and the extracts prepared inhibition presented against pathogens. While extracts prepared after the conservation and preservation processes recorded no inhibitory activity against the pathogens, it is assumed that a capacity antimicrobial activity present in or associated with it microorganisms polysaccharides possessing the "digueñe". This was confirmed by testing the inhibition of bacteria against phytopathogens, recording inhibition. Then deducting antimicrobial capacity is present in the bacterial isolates or polysaccharide that may contain bacteria.

8.- LITERATURA CITADA

- Aaronson, S.** 2000. The Cambridge world history of food. *Cambridge University*.
- Barros, L., Calhella, R. C., Vaz, J. A., Ferreira. I. C. F. R., Baptista, P. and Estevinho, L. M.** 2007. Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts. *Eur. Food Res. Technol.* 225: 151-6
- Barros, L., S. Falcao,** et al. 2008. Antioxidant activity of agaricus sp. mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Food Chemistry.* 111; 61-66.
- Bauer, AW. Kirby, WM Sherris, JC. Turck, M.** 1966. Antibiotic susceptibility testing by standarized single disk method.
- Beck, S. Piper, K. Farrand, S.** 1993. Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. Departments of Plant Pathology and Microbiology. University of Illinois at Urbana.
- Bhosle S. R., Bapat G., Vaidya Jitendra G., Garad Sandhya A. and Sonawane Hiralal B.** 2010. Antimicrobial activity of terpenoid extracts from *Ganoderma* samples. *Inter. J. of Pharm. and Life Sci.*, 1(4): 234-240.
- Boa, E.** 2005. Los Hongos Silvestres comestibles In: Fao (ed) *Perspectiva gloval de su uso e importancia para la población.*
- Bobek, P., & Galbavy, S.** 2001. Effect of pleuran (b-glucan from *Pleurotus ostreatus*) on the antioxidant status of the organism and on dimethylhydrazine induced precancerous lesions in rat colon. *British Journal of Biomedical Sciences*, 58. 164-168.
- Carillo, L.** 2003. Los Hongos. *Microbiología Agrícola.*
- Chang, S. T. B.** 1999. *Ganoderma lucidum* (Aphyllophoromycetidaee) a mushrooming medicinal mushrooms. *Internacional Journal of Medicinal Mushrooms*, 1.
- Chang, S. T. P.** 2004. *Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medical effect, enviromental impact.* CRC Press. Boca Raton.
- Cisterna, C. D.** 2007. Explotacion de Hongos Silvestres en Chile. *Micotec.*
- Concha, M.** 2012. Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos vegetales acuosos sobre *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales. Universidad de La Frontera.

- Cui, C. Y.** 2003. Polysaccharopeptides of *Coriolus versicolor*: Physiological activity, uses, and production. *Biotechnological Advances*. 2001.
- Curvetto, N.** 2009. Grifola frondosa (Maitake): Su valor nutraceutico, nutriceutico, farmaceutico y cosmeceutico. *Tecnología de producción Gifola frondosa (Maitake)*.
- Dominí, M.** 1995. Evaluación preeliminar del efecto antiapetitivo de diferentes extractos vegetales. *Bioplág* 95.
- Elmastas M, Isildak O, Turkekul I, Temur N.** 2007. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. *J Food Campos. anal*
- Espinosa, M. R.** 1926. Los Hongos chilenos del género *Cyttaria*. *Revista chilena de Historia Natural*, 206-256.
- Fia, D.** 1996. Introducción de nuevas especies de hongos comestibles: Estudio de Mercado. Chile: Fundación para la innovación Agraria.
- Funes, F.** 1997. Experiencias cubanas en agroecología. *Agricultura orgánica*.
- Gómez, Y.** 2002. Efecto del NaCl, aceite de salmón y temperatura, sobre la Difusión y Capacidad Antagonista de la Bactericina de Carnobacterium Piscicola L 103. Tesis Lic. Ing. Alimentos. Valdivia. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. 105p.
- Guzman, G., Salmones, G.** 2010. *EI cultivo de los hongos comestibles: con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agroindustriales*, México Instituto Politécnico Nacional.
- Harborne, JB.** 1993. *Phytochemical Dictionary. Handbook of bioactive compound from plannts*. Taylor & Francis.
- Hawksworth.** 2001. Mushrooms: The extent of the unexpected potential. *Internacional Journal of Medicinal Mushrooms*, 3.
- Hearst, R. N., ; Mccolum, G.; Millar, B.; Maeda, Y.; Golsmith, C.; Rooney, P.; Loughrey, A.; Rao, J. R.; Moore, J.** 2009. An examination of antibacterial and antifungal properties of constituents of Shiitake (*Lentinula edodes*) and Oyster (*Pleurotus ostraerus*) mushrooms. *Complementary Therapies in Clinical Practice*.
- Hiroshi, S.** 1993. Diverse biological activity of PSK (Krestin), a protein bound polysaccharide from *Coriolus versicolor*. *Mushrooms Biology and Mushrooms Products*.
- Huenchual, G., Gutiérrez, C., Morales, J., Kramm, C.** 2009. Proyecto conservas dulces y saladas.

- Itacab.** 2010. Ficha tecnológica: Enfermedades de los hongos comestibles.
- Jae-Soon.** 2005. Manual del Cultivador de Hongos: Cultivo de Hongo Ostra: Manejo de plagas y enfermedades. Universidad Del Nacional de Chungbuk.
- Ikekawa, T. U., Maeda. Y., Nakanishi. M., Fukuoka, F.** 1969. Antitumor activity of aqueous extracts of edible mushrooms. *Cancer Research*, 29.
- Kapper, C.** 1998. *Estimación productiva de Cyttaria espinosae en predio El Robledo.* Universidad De Chile.
- Karamau, M., E. Jovin, R, Malbasa, M Matavuly and M. Popovic.** 2010. Medicinal and edible Lignicolous fungi as natural sources of Antioxidative an antibacterial agents, *Phytotherapy Research*. 24: 1473-1481.
- Kitzberger, C. S., A.; Curi, R.; Salvador, S.** 2007. Antioxidant and antiicrobial activities of shiitake (*Lentinula edodes*) extracts obtained by organic solvents and supercritical fluids. *Journal of Food Engineering*.
- Lindquit, T. Julich, WD.** 2005. The pharmacological potential of mushrooms. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2.
- Lull, C., Wichers, J., Savelkoul, J.** 2005. Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. *Mediators of Inflammation*, 2.
- López, A. García, J.** 1997 Faq 1 de Cultivo de Hongos. Centro de Genética Forestal. Universidad Veracruzana
- Malajovich, M.** 2006. *Bioteología*, Bernal, Buenos Aires. Argentina.
- Martínez, P. M., M. Sobal, M. Bonilla, W. Martínez, Y. Mayett.** 2012. Los hongos comestibles, funcionales y medicinales. *Colegio de Postgraduados (COLPOS)*.
- Miles, T.** 1999. Biología de las setas. Instituto Zeri para Latinoamérica.
- Minuzo, T.** 1999. The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan. *Internacional Journal of Medicinal Mushrooms*. 1. 9-29.
- Mondino, P.** 2001. Control Biológico de enfermedades de plantas. En Perfil ambiental del Uruguay. 199-206
- NCI.** 1992. In-vitro anti HIV Drug Screening Results. Developmental Therapeutics Program National Cancer Institute.

- Pancel B.** 2002. *Agentes de daño en el bosque nativo.*
- Peralta, S. S. H., Victor M. Gomez Reyes.** 2006. Manejo y conservación de hongos comestibles de Tacámbaro, Michoacán. *La Jornada Michoacán* [Online].
- Peredo, H. L.** 1987. Fitoparásitos en *Nothofagus* chilenos. *Instituto de Silvicultura, Universidad Austral de Chile*, 8, 105-107.
- Rau, K., Wray, V., Nimtz, M., Wrenger, J., Cicek, H.** 2009. Production and structural analysis of the polysaccharide secrete by *Trametes versicolor* (coriolus) ATCC 200201. *Applied Microbiology and Biotechnonology*. 81.
- Rauha, J., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kahkonen, M., Kujala, K., Vuorela, H., Vuorela, P.** 2000. Antimicrobial effect of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*. 56(1) 3-12.
- Rebolledo, G.** 2011. Cunco celebró la cuarta versión del concurso gastronómico del digüeño. *La Nación*.
- Requeno, M. G.** 2012. Fabricación de jabones medicinales a partir de los extractos naturales: *Myroxylon balsamum* (Bálsamo de El Salvador); *Simarouba glauca* DC. (Aceituno) y su evaluación antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus.*, Universidad de El Salvador.
- Rojas, C., E.** 1995. Informaciones generales sobre productos forestales no madereros en Ecuador. En memoria, consulta de expertos sobre productos forestales no madereros para América Latina y El Caribe. *Serie Forestal N°1 FAO*.
- Saucedo M. y Gavilanes M.** 2005. Las Map Cinastas: Elementos de señalización en la defensa de las plantas contra patógenos. Departamento de Bioquímica, Conjunto E, Facultad de Química, UNAM.
- Schepetking, Q.** 2006. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic, potential. *International Immunopharmacology*, 6.
- Schmeda, G., Razmilic, I.** 1999. Biological activity and food analysis of *Cyttaria* spp. (*Discomycetes*) *Economic Botany*. 53(1): 30-40.
- Smith, J., Rowan, J., Sullivan, R.** 2002. Medicinal mushrooms: a rapidly developing ares of biotechnology for cancer therapy and other bioactivities. *Biotechnology Letters*. 24.
- Smith-Ramírez.** 1995. Algunos usos indígenas tradicionales de la flora del bosque templado. *Ecología de los bosques nativos de Chile Editorial Universitaria*.
- Sommerkamp, I.** 1990. Hongos de Guatemala II. Especies depositadas en el Herbario de la Universidad de San Carlos de Guatemala. *Revista Mexicana de Micología*, 6.

- Sullivan, R., Smith, J., Rowan, J.** 2006. Medicinal mushrooms and cancer therapy. Perspectives in Biology and Medicine. 49, 150-170.
- Tereschuck, M. Riera, M. Castro, G. Abdala, L.** 1997. Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta*. Journal of Ethnopharmacology. 56(3).
- Thetsrimuang, C., Khammuang, S., Sarnthina, R.** 2011. Antioxidant activity of crude Polysaccharides from edible fresh and dry mushrooms fruiting bodies of *Lentinus* sp. Strain RJ-2. International Journal of Pharmacology 7(1).
- Unep-Wcmc, M. C. S.** 2003. Proyecto de Comercialización de Productos Forestales No Maderables: Factores de Éxito y Fracaso.
- Valdebenito, C., Larrain, A., Kahler, F., Sotomayor, G.** 2003. Boletín Divulgativo n°13 "Hongos comestibles no tradicionales" Changle, Loyo, Gargal, Digueñe, Chicharón. INFOR: Innovación Tecnológica y Comercial de Productos Forestales No Madereros (PFNM) en Chile.
- Villalobos, MJ.** 1996. Plaguicidas de origen vegetal. Estado actual de la investigación. 21.
- Wallach, L., Oberpaur, Vacarezza, Maier.** 2010. Estudio preliminar de efectos antiicrobianos "In vitro" del mugo *Sphagnum magellanicum* BRID. *Agro Sur*, 38.
- Waser, W.** 1999. Therapeutic effects of substance occurring in higher basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. Critical Reviews in Immunology 19.
- Wasser, S.** 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. Applied Microbiology and Biotechnology. 60, 258-274.
- Wang, Y. C.** 1987. La Micología en la Antigua China. *Micologist*, 1.
- Wu, X.J and C. Hansen.** 2007. Antioxidant capacity, phenol content and polysaccharide content of *Lentinus edodes* grown in whey permeate-based submerged culture. J. Food Sci, 73: 1-8

