

Cultivando Hongos de Manera Fácil

**Cultivo de Hongos
en el Hogar
con Peróxido de Hidrógeno**

Volumen I

R. Rush Wayne, Ph.D.

Cultivando Hongos de Manera Fácil
Cultivo de hongos en el Hogar con Peróxido de Hidrógeno
Volumen I

Registro de la propiedad literaria © 2000
R. Rush Wayne, Ph.D.

Todos los derechos reservados. Ninguna parte de este trabajo puede reproducirse o puede usarse en cualquier forma o por cualquier medio sin permiso del autor.

Primera publicación con el título
Cultivando Hongos con Peróxido de Hidrógeno,
Diciembre, 1996
Y como
Cultivando Hongos de Manera Fácil
Producción de Hongos en el Hogar con Peróxido de Hidrógeno
Enero 1998
Edición revisada en Noviembre 1999
Volume I retitulado en Agosto 2000
Traducción en Español, Septiembre 2001, Néstor Curvetto

Visite las Páginas Web de Actualizaciones de Cultivando Hongos de Manera Fácil (<http://www.mycomasters.com/Esp/Actualizaciones.html>) para las correcciones periódicas y actualizaciones a este manual, notas sobre fuentes de suministros, y noticias sobre el método del peróxido.

CONTENIDO

1 **Introducción**

Prefacio

2 **Los Hongos**

Hypsizygus ulmarius (ostra del Olmo)

Pleurotus eryngii (ostra Rey)

Hericium erinaceus (lion's Mane, Melena de León)

Agaricus subrufescens (hongo de la Almendra)

Lentinula edodes (Shiitake)

Pleurotus ostreatus (hongos Ostra)

Ganoderma lucidum (hongo Reishi)

Coprinus comatus (shaggy Mane, Melena Lanuda)

Hypsizygus tessulatus (Shimeji)

Stropharia rugosa-annulata (Stropharia Rey)

Agaricus bisporus/brunnescens (hongo "botón blanco" o "champignon")

5 **Equipo que usted necesitará**

6 **Suministros especiales que usted necesitará**

6 **Los Fundamentos sobre el Peróxido**

Qué hace el peróxido

Efecto biológico del peróxido

Ventajas de usar peróxido en el cultivo del hongo

Resistencia de Contaminantes al peróxido

7 **Qué no hace el peróxido**

La necesidad de precauciones al exponer micelio

El peróxido no es un esterilizante en las concentraciones que permite el crecimiento de hongos

8 **Consideraciones sobre seguridad y ambiente para el uso del peróxido de hidrógeno**

El peróxido y el espíritu del cultivo orgánico

Carencia de efecto del peróxido sobre el sustrato o cultivos del hongo

9 **Estabilidad**

En solución pura

A temperaturas más altas

En presencia de enzimas que descomponen peróxido

Preservando la pureza de la solución madre de peróxido

14 **Variaciones en la concentración del peróxido de fuentes comerciales**

Midiendo la concentración del peróxido
Calculando cuánta solución de peróxido usar

14 **Produciendo y Manteniendo Cultivos en Agar**

Preparando placas de agar

Medio MYA

Use la concentración eficaz más baja de peróxido en agar

16 **Medio de agar sin uso de presión**

Riesgo de salpicaduras de agar e importancia de placas limpias
Reusando medio de agar-peróxide

18 **Adquiriendo cultivos de hongos**

La importancia de comenzar con cepas buenas
Clonación de hongos

Almacenamiento de cepas

El método del agua destilada
Mantenga los cultivos en almacenamiento sin peróxido

20 **Inoculando y manejando cultivos de agar**

Enfriando bisturíes calientes
Inoculando desde cultivos en almacenamiento o de medios sin peróxido
Previene la contaminación oculta con inoculación profunda: limpieza del micelio
Incubando placas inoculadas y almacenando placas no inoculadas

23 **Haciendo blanco de hongo**

Ventaja económica de hacer su propio blanco de hongo
Ventajas del blanco basado en aserrín

24 **Blanco en aserrín "Diez minutos" sin autoclave**

Suplementos de nitrógeno compatibles con blanco de diez minutos
La importancia de recipientes limpios haciendo el blanco de diez minutos.

26 **Blanco en aserrín esterilizado a presión**
Blanco en grano

Las dificultades del blanco en grano y trampas en fabricación del blanco

28 **Recipientes para el blanco**

- 29 **Inoculando el blanco**
Método del trozo de Agar
El uso de micelio adaptado al peróxido para la inoculación del blanco
Incubando y agitando el blanco
Cultivo líquido
- 31 **Colonización de Substrato en Masa**
Importancia de escoger sustratos que carecen de enzimas que descomponen peróxido
Sustratos pasteurizables compatibles con peróxido
Recetas para hacer fructificar los sustratos
- 32 **Virutas de madera y densidad del sustrato**
- 33 **Preparando aserrín suplementado con peróxido**
- 34 **Suplementos de nitrógeno para el sustrato en masa**
Calculando cuánto suplemento agregar
- 36 **Midiendo el pH del sustrato**
- Recipientes para el cultivo**
Bolsas de basura como recipientes para el cultivo
Excluyendo las mosquitas de los hongos
Balde de plástico como una alternativa a las bolsas
- 37 **Inoculando aserrín suplementado**
Rompiendo al blanco para la inoculación en sustratos para fructificar
Agregando el blanco al sustrato
- 39 **Formación del Hongo**
Procedimientos generales para la fructificación de los hongos del tipo ostra y *Herichium*
Protegiéndose de las esporas
Hongos que necesitan una capa de cobertura
- 42 **Planificación estacional**
- 43 **El cultivo al aire libre vs. en el interior**
Cosecho
- 43 **Dificultades**
- 44 **Conclusión**
Sobre el Autor
Sobre el Traductor

Introducción

Cuando por primera vez tuve interés en cultivar hongos, busqué en la librería un libro muy conocido sobre el cultivo de hongos y lo leí ávidamente. Pero mi interés pronto se convirtió en un desaliento general cuando leí sobre todo el equipo y procedimientos que el libro insistía eran necesarios para cultivar hongos. Para obtener cultivos no contaminados, yo necesitaría un laboratorio estéril, con un gabinete de flujo de aire laminar estéril provisto con filtros electrostático, filtros HEPA y una luz ultravioleta. Este laboratorio necesitaría una entrada con “cerradura” de aire estéril y un lavapies. Yo necesitaría tener ropa especial para entrar en él, y debería lavar los pisos con hipoclorito de sodio comercial (lavandina, blanqueador) todos los días. Además, mis hongos en fructificación tendrían que crecer en un cuarto separado, para evitar que las esporas entren en el laboratorio estéril. Estos cultivos en fructificación tendrían que haber crecido en bolsas de plástico especialmente diseñadas con parches de filtros microporosos, para que el micelio del hongo pudiera conseguir oxígeno sin permitir que entren las esporas de mohos o bacterias. Por supuesto, necesitaría un autoclave o por lo menos una olla a presión especialmente diseñada para esterilizar los medios que llenarían estas bolsas.

Después de considerar brevemente estos requisitos, deseché el pensamiento de cultivar hongos. Ni remotamente pensaba conseguir todos esos equipos, y consideré que probablemente no estaba hecho para ese trabajo. Por lo que yo pude entender, mi hogar sería una trampa mortal para el cultivo de hongos. Ni mi esposa ni yo somos caseros cuidadosos. Nosotros tenemos un imperturbable desorden y polvo y cosas “algodonosas” verdes y blancas pueden encontrarse dentro y fuera del refrigerador. Aunque era experimentado en el trabajo con técnicas estériles de mi época como estudiante graduado en bioquímica, no pensé que eso me salvaría de las legiones de ávidos contaminantes que ciertamente perseguirían cada movimiento que intentara para hacer para cultivar algo tan delicioso como los hongos.

Sin embargo, el pensamiento de cultivar hongos no desaparecía completamente. En cambio, aproximadamente un año después, la idea volvió tomando una nueva forma. Había leído que los medios de cultivo usados para hacer germinar semillas de orquídea podían liberarse de contaminantes si se agregaba peróxido de hidrógeno al medio. Mientras el peróxido mataba bacterias, levaduras, y esporas fúngicas, dejaba viables a las semillas de orquídea porque éstas contenían suficientes enzimas que descomponen peróxido para protegerlas. Así, las semillas de orquídea podían germinar y ser fácilmente atendidas por principiantes sin la necesidad de una técnica estéril estricta.

De manera que aquí surgía una pregunta: ¿podría usarse el peróxido para preservar los medios de cultivo de hongos libres de contaminantes como en los medios de la semilla de orquídea? Si fuera posible, entonces quizás el cultivo de hongos podría ser accesible a los principiantes, así como lo fue la germinación aséptica de semillas de orquídea. Entonces decidí probarlo con el micelio de hongo.

Lo que siguió fue un proceso suficientemente complicado y no lineal de aprendizaje sobre el crecimiento de distintos hongos, experimentando con agregar peróxido de hidrógeno, probando concentraciones diferentes, aprendiendo sobre diferentes medios de cultivo y cómo ellos interactuaban con los hongos y con el peróxido, intentando diferentes temperaturas y técnicas de pasteurización y esterilización,

volviendo a los fundamentos iniciales con mejores mediciones de pH, experimentando con suplementos, rastreando fuentes de contaminación, ajustando mis procedimientos, y así sin parar, hasta que desarrollé algunas pautas suficientemente fiables para lo que estaba haciendo. Todo esto tomó mucho más tiempo del que alguna vez habría supuesto. Pero el resultado fue positivo: el cultivo de hongos puede hacerse accesible a los principiantes sin la necesidad técnicas estériles, filtración de aire, o incluso una olla a presión, si uno agrega el peróxido de hidrógeno para ayudar a mantener los medios de cultivo de hongos libres de contaminantes. Usando las técnicas que desarrollé, ahora los principiantes pueden llevar a cabo todas las fases del cultivo de hongos, con una variedad amplia de especies, y sin invertir una pequeña fortuna en equipo y medios.

He escrito este libro como una guía para el aficionado interesado en el cultivo de hongos, libro que podría servir al cultivador autosuficiente para producir varias especies deliciosas de hongos en el hogar, y que cualquiera puede usar, incluso el principiante. Mi manual anterior, *Growing Mushrooms with Hydrogen Peroxide*, está escrito para el productor de hongos que ya está familiarizado con métodos tradicionales de cultivo de hongos, y su enfoque es sobre el uso del peróxido de hidrógeno como una mejora a los métodos tradicionales. Mientras que aquel manual hizo posible por primera vez realizar todas las fases del cultivo de hongos gourmet en el hogar sin técnicas estériles ni filtración de aire, el libro actual va aún más allá y presenta procedimientos que no requieren esterilización a presión.

Por supuesto, no todos los procedimientos descritos en este libro fueron creados por mí. En particular, cualquier procedimiento no requerido específicamente para usar la técnica del peróxido, o no específicamente hecho posible por la técnica del peróxido, probablemente se ha originado en otra parte.

Para el tratamiento a fondo de los métodos tradicionales de cultivo de hongos, tanto como para los requisitos de crecimiento para una amplia gama de especies de hongos, por favor consulte a Stamets, *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*, Chilton y Stamets, *The Mushroom Cultivator*, u otro texto básico. Son valiosos libros de referencia para cualquiera que seriamente quiera seguir el cultivo de los hongos en detalle. También, a medida que heche una mirada a través de estos libros, con página tras página de discusión de laboriosos procedimientos de esterilización y de fuentes de contaminación, usted aumentará su apreciación por las simples técnicas contenidas en este manual.

Note que la técnica estéril o aséptica, que los procedimientos en este libro requieren en alguna medida, es siempre mejor demostrada que descripta. Es mi esperanza que el lector buscará instrucción directa en este sentido. Su sociedad local de micología puede ser útil para esta finalidad.

También note que este libro no tiene la intención de ser una guía para el cultivo comercial de hongos, aunque los métodos que se describen aquí bien pueden ser de valor para productores a pequeña escala comercial así como al aficionado en el hogar.

Preliminares

Los Hongos

Casi cualquier hongo que es actualmente cultivado puede hacerse crecer en el hogar. Sin embargo, algunos son más fáciles de cultivar que otros, y algunos, aunque fácil, no son tan reconfortantes como otros que son más difíciles.

Yo actualmente me enfoco sobre cuatro hongos para cultivar en mi propio hogar. Éstos son:

Hypsizygus ulmarius, el hongo ostra del olmo u hongo del olmo blanco: aunque no es un miembro de la familia del hongo ostra, es similar al ostra en apariencia y hábito. Crece agresivamente en aserrín o paja, raramente tiene problemas de contaminación siguiendo las técnicas aquí descritas, y prolifera bien en una variedad de condiciones y temperaturas, fructificando tanto vertical como horizontalmente. Cuando se cultivan correctamente, los hongos son grandes y atractivos, semejando flores blancas extrañas, y ellos son en mi opinión los más deliciosos de los hongos de tipo ostra (sin contar a *P. eryngii*).

Pleurotus eryngii u ostra rey: miembro de la familia del hongo ostra, pero no tiene la apariencia o hábito usual del hongo ostra. Nativo de Europa, crece de la tierra con un “estilo real”, en lugar de crecer en los árboles y leños. Es grande y carnoso. Sus requisitos de sustrato y de temperatura son más estrechos que para otros ostras. He leído que prefiere el aserrín a la paja, aunque no he experimentado suficientemente con él en paja para confirmar o negar esto. Fructifica mejor a temperaturas de otoño o primavera y crece a un paso glacial en el frío del invierno, mientras que agoniza en los días más calientes del verano. Es uno de los más deliciosos de los hongos cultivados si se lo cocina apropiadamente, salteando rápidamente en una cacerola ancha, sin permitir que se estofe en su propio jugo, luego salando ligeramente.

Hericiium erinaceus o Melena de León, también llamado hongo Pom Pom: un hongo que carece de tallo y sombrero como aparecen en un negocio tradicional de hongos comestibles, en cambio, se presenta como un tipo de bola de nieve cubierta con “pelos” blancos. Crece rápidamente sobre sustratos de aserrín, y fructifica fácilmente en un rango de temperaturas. He oído que también se puede cultivar en paja, aunque nunca lo he probado. Los cocineros aman este hongo, y de hecho tiene un delicioso sabor gourmet a veces con sabor a langosta.

Agaricus subrufescens u hongo almendra: un miembro de la familia que incluye el doméstico hongo botón (champignon) y el Portobello. Se lo distingue por su inequívoco sabor a extracto de almendra. Como el hongo doméstico, prefiere crecer en sustrato compostado, pero también puede hacerlo en paja, virutas de madera, o aserrín suplementado. Es un hongo de clima templado, pero también fructificará en el invierno en un cuarto calefaccionado, siendo por ello un buen candidato para cultivar durante todo el año. Este hongo generalmente necesita una capa de cubierta - una capa de una mezcla friable similar a tierra que usualmente contiene turba-- aplicada a la superficie del cultivo con el propósito de formar cuerpos de fructificación.

Algunos otros hongos para considerar incluyen:

Lentinula edodes o Shiitake: popular por siempre, cultivado por muchas personas y del cual se ha escrito extensivamente. No soy un cultivador de Shiitake, pero los métodos de manejo del cultivo, de blanco y la preparación del sustrato que aquí se describen servirán tan bien para el shiitake como para los hongos que usualmente cultivo. Si usted decide cultivar esta especie usando pellets de aserrín como sustrato

en masa, esté seguro de conseguir una cepa de shiitake seleccionada para el crecimiento en aserrín. Están disponibles las cepas de clima templado y fresco.

Pleurotus ostreatus y otras especies de hongo ostra: como el *H. ulmarius*, están entre los hongos más fáciles de cultivar proliferando a través de aserrín, paja y una variedad de otros sustratos. Ellos fueron los primeros hongos que fructifiqué usando el método del peróxido. Existen cepas para la mayoría de los rangos de temperatura. Las esporas de *P. ostreatus*, que se liberan de los cuerpos de fructificación maduros en gran cantidad, pueden causar problemas de salud.

Ganoderma lucidum o Reishi: el hongo medicinal de mayor predicamento por poseer propiedades de estimular el sistema inmunológico. Este hongo crece en aserrín de madera dura y en temperaturas templadas. Una especie relacionada proveniente del Noroeste del Pacífico, *Ganoderma oregonense*, prefiere temperaturas más frías. Estos hongos son de textura leñosa y se trocean para hacer té.

Coprinus comatus o Melena Lanuda: un hongo efímero de sabor suave, que crece mejor en sustrato compostado. Nunca conseguí fructificarlo en el interior, pero después que tire los cultivos en mi patio, allí aparecieron por un par de estaciones.

Hypsizygus tessulatus o Shimeji: un hongo simpático, pequeño y redondeado, con una textura crujiente; crece en paja o en sustratos a base de aserrín. La cepa que compré requería temperaturas cercanas al congelamiento para iniciar la fructificación, así que no experimenté mucho con él, pero hay otras cepas que probablemente fructifiquen sin aquel requerimiento.

Stropharia rugosa-annulata o Rey Stropharia: un hongo grande que crece en camas de virutas de madera o paja y exige una cubierta y clima templado para fructificar. El micelio crece lentamente, y actualmente sólo se conoce una variedad que fructifica en el interior sin importar la estación del año.

Agaricus bisporus/Agaricus brunnescens o el hongo “botón blanco o champignon”, también el hongo “botón marrón”, crimini y portobellos: tantos hongos botón son ahora cultivados por grandes granjas comerciales en los EEUU, y son vendidos tan baratos, que estas compañías ya no pueden obtener ganancias. Como el hongo almendra, el sustrato de crecimiento preferido por los hongos botón y portobellos es el compost. La preparación de un compost de calidad es un proceso complicado que requiere mucho trabajo intensivo, que está más allá del alcance de este manual. Pero los hongos botón también pueden cultivarse sobre paja preparada por el método del peróxido (vea el Volúmen II). El rendimiento no será tan alto como en el compost, pero la paja es tan fácil de preparar en el hogar que a Ud. probablemente no le importará tener un menor rendimiento. Como con el hongo almendra, se requiere una capa de cobertura para la fructificación una vez que el micelio ha colonizado la paja. Pero los hongos botón requieren condiciones de menor temperatura. El blanco de hongo se puede preparar con grano cocinado a presión (este volumen) o con arroz instantáneo al vapor (vea el Volúmen II, “Blanco de Hongo de Diez Minutos en Grano”)

Equipo que usted necesitará



Los métodos descritos en este manual para cultivar sus propios hongos en el hogar requieren muy poco equipamiento. El manejo y la medición del peróxido de hidrógeno requieren sólo una pipeta de medición (de 10 ml) y una probeta graduada (probablemente de 100 o 250 ml). Éstas pueden comprarse en comercios de artículos para laboratorio. Para medir la concentración de peróxido que tienen las botellas que usted compra en la farmacia, también necesitará un tubo de ensayo pequeño con reborde, y un globo. La preparación de blanco de hongos requiere frascos (de aproximadamente litro) con tapas, una olla con tapa suficientemente grande para contener los frascos para cocinar al vapor fluente, una balanza pequeña, y algunas bolsas de plástico transparentes del tipo de guardar comida. La preparación de cultivos de agar requiere además un juego de cajas o placas de petri. Recomiendo las placas de petri de plástico reusable, si usted puede encontrarlas. Yo compré las más en mi negocio local de artículos de laboratorio. Una olla a presión, aunque no es completamente necesaria, será útil. Éstas pueden encontrarse a menudo usadas en negocios de segunda mano donde venden artículos para cocinar, o nuevas en la sección de utensilios de cocina de ferreterías y bazares. Asegúrese que la olla a presión que usted consigue sea suficientemente alta como para acomodar sus frascos. Usted NO necesitará una caja especial con guantes, filtros HEPA, luces ultravioletas, un laboratorio estéril, gabinetes de flujo laminar, cerraduras de aire, recipientes lava pies, etc. etc.

La preparación y el manejo de substrato en masa de pellets combustibles (a base de aserrín) requieren una olla cubierta para hervir y enfriar agua, un segundo recipiente como una tetera para hervir agua para la pasteurización de recipientes, y un balde plástico grande como de unos 20 litros con una tapa que cierre muy bien. A menudo estos baldes se pueden conseguir gratis o comprar baratos en las fábricas de helado y distintos tipos de establecimientos de preparación de comidas (evite baldes que se han usado para pintura, solventes, u otras sustancias tóxicas).

Para el cultivo en el substrato en masa, usted necesitará también algunas cajas pequeñas (usualmente con una capacidad de aproximadamente 8 litros, o 20 x 20 x 20 cm) y algunas bolsas largas de plástico de cocina nuevas de alta densidad de 0.5 mil o menos (evite las bolsas de plástico blando y grueso), o un grupo de baldes de plástico

de aproximadamente 8 a 12 litros con tapas. Para ayudar a los hongos a lo largo de su crecimiento, usted necesitará un pulverizador de mano, y un lugar fresco. Después, si usted está cultivando muchos hongos, usted puede necesitar un ventilador y un sistema automático de niebla.

Suministros especializados que usted puede necesitar

Para hacer el medio de agar, usted necesitará agar, polvo de malta liviano, y (si usted planea cocinar su medio a presión) extracto de levadura en escamas, entre otras cosas. El agar está disponible en algunos negocios de alimentos dietéticos o almacenes naturales, o a través de los comercios de suministros para laboratorio, o distribuidores de suministros para hongos. Note que aunque el agar solo es más caro que la mezcla de medio MYA lista para usar, este último contiene sólo la mitad o menos de agar en peso, por lo cual no es necesariamente una buena compra. El polvo de malta está disponible en negocios de suministros para preparar bebidas caseras o de venta de productos para laboratorio. Las escamas de extracto de levadura están disponibles en los negocios de alimentos dietéticos.

Para hacer blanco de hongo y substrato en masa, usted necesitará pellets de fibra de papel y pellets combustibles madera. Los pellets de fibra de papel se venden en mi área como Animal Bedding (cama para animal) de Crown™ o Cat Litter (cama para deyecciones de gato) de Good Mews™. (Busque en negocios de comestibles, negocios de suministros para mascotas, negocios de artículos para jardín y granja, etc.). En áreas rurales de EE.UU. y Canadá, los pellets combustibles de madera pueden encontrarse en negocios de comestibles, ferreterías, negocios de artículos para granjas, negocios que venden pellets para estufas, etc. En áreas urbanas, busque en su guía telefónica por distribuidores de pellets de madera para estufas, o pregunte a sus amigos rurales. El conseguirlas puede llevarlo a un paseo afuera pueblo. Intente averiguar de qué tipo de madera están hechas, y busque madera dura para la mayoría de los hongos (sin embargo los pellets de abeto, funcionarán bien para el *P.eryngii* y *A. subrufescens*).

Los Fundamentos sobre el Peróxido

Qué hace el peróxido

El radical peróxido es una forma reactiva de oxígeno que ataca distintos compuestos orgánicos. En células vivientes, daña el material genético, membranas celulares, y cualquier otra cosa que encuentre para reaccionar. Al hacer eso, el peróxido en suficiente concentración puede matar bacterias, endosporas bacterianas, levaduras, y esporas de hongos, incluso las de hongos comestibles. Aparentemente, también puede matar pequeñas partículas de hongos presentes en el aire, y a los contaminantes asociados a las células de la piel humana, las cuales se dice que continuamente están descamándose del cultivador de hongos. Así, el peróxido de hidrógeno actúa en alguna extensión contra todos contaminantes aéreos usualmente encontrados en el cultivo de hongos, incluyendo las esporas mismas de los hongos. En contraste, los antibióticos generalmente actúan sólo contra la contaminación bacteriana, y los fungicidas sólo actúan contra las levaduras y hongos.

La belleza del peróxido es que no mata el micelio del hongo establecido ni interfiere con su crecimiento y fructificación. A pesar de la amplia gama de acción del peróxido contra los contaminantes comunes del cultivo de hongos, hay un rango de concentraciones relativamente amplio en el que el peróxido permitirá el crecimiento y fructificación del micelio del hongo. El micelio establecido, debido a su habilidad de producir altos niveles de enzimas que descomponen al peróxido, puede evidentemente defenderse contra concentraciones mas altas de radical peróxido que las que pueden

soportar las esporas aisladas, las células o los fragmentos diminutos de organismos multicelulares. De manera que nosotros podemos agregar peróxido de hidrógeno al cultivo de hongos y el micelio crecerá pero los pequeños contaminantes se morirán.

Este arreglo tiene varias ventajas. La más obvia es que reduce la necesidad de facilidades y equipos costosos y elaborados para controlar los contaminantes medioambientales. Con el agregado de peróxido de hidrógeno al medio de cultivo para hongos, es posible realizar todas las fases del cultivo tradicional de hongos, desde el aislamiento hasta la fructificación, en forma exitosa en ambientes no estériles con aire no filtrado. Desapareció la necesidad de cuartos limpios especiales, filtros HEPA, pre-filtros, gabinetes de flujo laminar, luces UV, cierres de aire, cajas con guantes, o cualquier otro equipo asociado con el control medioambiental de la contaminación microbiana -- incluso filtros microporosos en bolsas y tapas de frasco son superfluos. Usando Peróxido, el equipo mínimamente requerido para el control de la contaminación se reduce a algunos instrumentos de medición, una fuente de agua hirviente, y una olla grande para cocinar al vapor (o una olla a presión para una mayor seguridad) --muy poco más elaborado de lo que se encuentra en muchas cocinas. Y mientras que los métodos tradicionales de cultivo de hongo requieren habilidad en técnica estériles y una limpieza personal inmaculada para el éxito con el cultivo en agar y con el blanco, el uso del peróxido permite el éxito con sólo una modesta técnica estéril y una mínima atención a la higiene personal. Más aún, se hace posible fructificar hongos --incluso aquéllos que tienen la más alta carga de esporas-- en el mismo cuarto usado para mantener el cultivo de agar y crecer el blanco, sin temor a que las esporas liberadas por los cuerpos en fructificación difundan en el cultivo de agar y los estropee. El peróxido de hidrógeno tiene la capacidad de matar las esporas de los mismos hongos cuyo micelio protege.

Los contaminantes desarrollan resistencia al peróxido, en la manera en que ordinariamente lo hacen los antibióticos? Sí y no. Muchos de los contaminantes ya son resistentes a peróxido, y una vez que ellos han establecido una colonia, crecerán vigorosamente. El moho *Aspergillus* (azul verde) es muy resistente al peróxido. Pero evidentemente el peróxido en suficiente concentración sobrepasa los mecanismos de resistencia de los organismos unicelulares y esporas aisladas, y también la de aquéllos organismos multicelulares aislados muy pequeños.

Qué no hace el peróxido

Una cosa que el peróxido NO hace es eliminar toda la necesidad de preocuparse por una técnica estéril. Repitiendo, aunque el peróxido agregado matará esporas aisladas, levaduras y bacterias que entren en sus cultivos, y éstas son una gran parte de los problemas de contaminación rutinarios, el peróxido NO mata a los organismos multicelulares vivos establecidos (como el del moho verde) más allá de un cierto tamaño. Tampoco lo hará muy bien contra concentraciones locales altas de esporas del moho. Evidentemente los organismos multicelulares y las concentraciones altas de esporas germinadas son capaces de producir suficiente enzimas que descomponen peróxido para defenderse contra las altas concentraciones externas de peróxido. Y ya que los organismos multicelulares y las concentraciones de esporas pueden ser microscópicas y pueden residir en sus manos o en partículas de suciedad o polvo, usted todavía tiene que tomar precauciones sensatas para mantener sus manos y a todos los materiales no estériles, lejos de sus cultivos en fase temprana, incluso con peróxido agregado. Aunque usted no tendrá que tener miedo de dejar cultivos expuestos al aire durante tiempos breves para realizar manipulaciones o para inspeccionarlos, todavía necesitará usar el sentido común para evitar la

contaminación. Usted no querría usar la tapa de una caja de Petri después que se le cayó al suelo, por ejemplo. Ni debería permitir que los residuos visibles no estériles de cualquier clase entren en sus cultivos, o que entren insectos de cualquier tipo. Es una buena idea limpiar periódicamente el polvo de los estantes usados para incubar cultivos. Usted todavía necesitará flamear o esterilizar de alguna forma cualquier instrumento que use para transferir trocitos de micelio de un cultivo a otro. Y, como una práctica regular yo limpio mis dedos con alcohol para desinfectar antes de realizar inoculaciones de blanco o cultivos de agar. Hago lo mismo con cualquier superficie de mesada donde realizo las manipulaciones con mis cultivos en cajas de petri. Esto reduce las oportunidades de que partículas más grandes entren en los cultivos y ayuda a proteger el micelio expuesto.

También es especialmente importante saber y recordar que el peróxido NO protege de contaminantes aéreos al micelio mismo del hongo. El micelio descompone al peróxido que entra en contacto con él, así que cualquier contaminante aéreo asociado con el micelio se escudará de los efectos deletéreos del peróxido. Así, como regla general, el peróxido sólo protege de la contaminación aérea al medio de cultivo o al sustrato. De manera que debe reservar sus procedimientos más cuidadosos para transferir micelio, o para realizar cualquier operación que exponga el micelio al aire no filtrado. Y una vez que su micelio se contamina, usted necesitará volver a empezar con un cultivo nuevo no contaminado, o deberá purificar el tejido de su hongo de alguna manera para librarlo de contaminantes. Discutiré esto más tarde.

Finalmente, el peróxido no es un esterilizante excepto en concentraciones que son demasiado altas para usar en el cultivo de hongos. Es decir, usted generalmente no puede usar peróxido de hidrógeno por sí mismo para esterilizar medios de cultivo o sustratos del hongo. A las concentraciones en que es compatible con el crecimiento del hongo, el peróxido de hidrógeno no matará mohos contaminantes vivos residentes en el medio, y el propio peróxido será rápidamente destruido por las enzimas que descomponen peróxido en materiales orgánicos no estériles. Aunque algunas esporas y bacterias pueden ser eliminadas agregando peróxido a medio no estéril, habrá una gran cantidad de contaminantes que sobrevivirán fácilmente y que crecerán en poco tiempo. Por consiguiente la regla general es: todos los materiales de cultivo y recipientes deben pasteurizarse antes de agregar a ellos el peróxido o el medio que contiene peróxido; los materiales de cultivo que contienen materia orgánica no procesada deben esterilizarse a presión para destruir las enzimas que descomponen al peróxido. Y un corolario: cualquier agua sin estar esterilizada a presión que se use en un medio tratado con peróxido debe ser limpia y libre de partículas obvias, ya que cualquier minúscula presencia de material orgánico o incluso inorgánico introducida con el agua podría albergar contaminación viva y/o enzimas que descomponen al peróxido que no serían destruidas por pasteurización.

Consideraciones sobre seguridad y ambiente para el uso del peróxido de hidrógeno

No hay precauciones especiales de seguridad que se requieran para el manejo de peróxido de hidrógeno al 3%. Su toxicidad es muy baja, y cuando se derrama o ingiere se descompone completamente en agua y oxígeno. Es inodoro y no mancha ni quema. Generalmente ni siquiera es activo como blanqueador hasta que alcanza 60°C, la temperatura de agua corriente muy caliente. Toda la evidencia sugiere que es medioambientalmente benigno.

Ya que el peróxido comercial se prepara químicamente, en lugar de extraerse de fuentes naturales, probablemente no puede ser considerado compatible con las

normas de certificación orgánica según los criterios actualmente en boga. Sin embargo, considero que el uso del peróxido se incluye en el espíritu del cultivo orgánico. Ya que el peróxido que se agrega a los cultivos de hongos se descompone completamente en agua y oxígeno a medida que el micelio del hongo ocupa el sustrato, no puede haber ningún rastro de dicho peróxido en el hongo cosechado, más allá de lo que hay naturalmente allí debido a procesos metabólicos. Es más, el peróxido de hidrógeno se encuentra naturalmente en todo los organismos aeróbicos vivientes y en una variedad de ambientes naturales. Desde tiempo inmemorial, las abejas melíferas han secretado enzimas que agregan peróxido a su néctar, protegiéndolo de las bacterias, levaduras, y mohos, e impartiendo propiedades antibacterianas a la miel que producen. Los micelios de ciertos hongos producen su propio peróxido para ayudar a degradar el sustrato leñoso que encuentran. Y el peróxido incluso es una parte de las defensas curativas del organismo humano. De hecho, alrededor del mundo, miles de defensores de un sistema de sanación llamado terapia de oxígeno realmente ingieren solución de peróxido de calidad alimentaria sobre una base diaria para curar varias enfermedades y promover la vitalidad, y algunas personas lo han hecho así durante muchos años (sin embargo yo no recomiendo esto necesariamente). Finalmente, el uso del peróxido permite eliminar la necesidad de equipos, facilidades y suministros caros, simplificando cada fase del proceso del cultivo de hongos.

Surge la pregunta acerca del efecto que la oxidación por peróxido puede tener sobre el sustrato del hongo. El cloro, cuando reacciona con materiales orgánicos como la pulpa de papel, produce cantidades pequeñas de dioxina, un compuesto químico muy peligroso que causa cáncer. El peróxido de hidrógeno no produce dioxina, y por ello, los activistas ecológicos están haciendo campaña para conseguir que las compañías de papel blanqueen su fibra de papel con peróxido en lugar de cloro. Sin embargo, es concebible que el peróxido pueda producir alguna otra sustancia dañina cuando reacciona con materiales orgánicos en los sustratos para hongos. No he deshechado esta posibilidad, pero la considero improbable. En primer lugar, los organismos aeróbicos vivientes han evolucionado por millones de años con peróxido de hidrógeno tanto dentro como alrededor de ellos. El peróxido es generado por el metabolismo aeróbico normal, y también se forma naturalmente por reacción del agua con oxígeno en respuesta a los rayos ultravioletas de la luz solar. Esto probablemente significa que los organismos aeróbicos han desarrollado una maquinaria metabólica para tratar en forma segura con una variedad de productos de oxidación que resultan de la reacción del peróxido con materiales biológicos. Además, el peróxido de hidrógeno es químicamente bastante estable en sustratos esterilizados para hongos, y la concentración de peróxido que nosotros estamos usando es tan baja que la cantidad de sustrato que se está oxidando, de hecho tiene que ser muy baja. Finalmente, no he visto absolutamente evidencia de ningún efecto mutagénico o tóxico del sustrato tratado con peróxido sobre el micelio o los cuerpos de fructificación. Los cultivos de agar conteniendo peróxido de hidrógeno dan halos normales y saludables de micelio, y los cultivos finales en fructificación producen hongos tan bonitos como cualquier hongo crecido por métodos tradicionales.

Estabilidad

La solución 3% de peróxido de hidrógeno disponible en los supermercados y farmacias, con ácido fosfórico agregado como estabilizador, es suficientemente estable en el estante cuando se lo mantiene relativamente fresco. Cuando es agregado a medios de cultivo para hongos luego de esterilizados por calor y enfriados, evidentemente el peróxido de hidrógeno se descompone muy lentamente. Cuánto tiempo dure con exactitud es probablemente una función compleja que depende de la

composición de los medios de cultivo, la concentración de peróxido, y la temperatura. Sin embargo, mi experiencia hasta ahora es que ese peróxido continúa excluyendo contaminantes por tiempo suficiente como para permitir que el micelio de una variedad de especies de hongo colonice en forma segura sus substratos.

Por otro lado, el peróxido de hidrógeno generalmente no debe agregarse a medios de cultivo calientes, a menos que usted vaya a agregar una cantidad extra para compensar las pérdidas por descomposición. Ya que el peróxido se vuelve activo como blanqueador por encima de los 60°C, se descompondrá fácilmente cuando entre en contacto con materiales orgánicos complejos a esta temperatura y superiores. Así que espere hasta que su medio se haya enfriado --si no a temperatura ambiente, por lo menos a una temperatura que sea cómoda al tacto-- antes de agregar el peróxido.

En contraste con su comportamiento en solución pura o en los medios esterilizados, el peróxido se degrada rápidamente en presencia de enzimas que descomponen peróxido, como pasa cuando usted pone peróxido sobre una herida. Las células de la piel dañadas y los vasos sanguíneos rotos de una herida contienen gran cantidad de enzimas que descomponen peróxido, y que rápidamente degradan la solución de peróxido liberando burbujas de oxígeno. Enzimas similares, conocidas como catalasas y peroxidasas, se encuentran en todos los tipos de materiales vivos o que una vez estuvieron vivos, a menos que éstos hayan sido tratados con calor o extensivamente procesados. De manera que, granos sin cocinar, harina, aserrín, madera, etc. todos destruirán el peróxido en corto plazo. Esto significa que usted necesitará mantener tales materiales fuera de su solución estándar de peróxido. También significa que si quiere incorporar tales materiales en el medio de cultivo, usted tiene que estar seguro que todo lo que compone ese medio sea exhaustivamente tratado con calor o cocinado para destruir las enzimas que descomponen peróxido antes de que usted agregue el peróxido.

Yo tomo varias medidas para preservar la pureza de mi solución estándar de peróxido. Cuando estoy a punto de retirar peróxido, primero limpio bien la tapa y la parte superior de la botella con alcohol para desinfectar, para mantener afuera las partículas que podrían contener contaminantes vivos. Entonces vierto la solución a un vaso de medida pasteurizado o uso una pipeta limpia, pasteurizada con el extremo de la boca taponado con algodón. Las pipetas no necesitan ser autoclavadas, pero por lo menos deberían ser sumergidas en agua hirviente (llenas hasta un poco más arriba de la parte graduada, pero debajo del tapón de algodón) durante unos minutos, luego enfriadas, antes de usarlas con el peróxido. Una probeta graduada de cien mililitros es un recipiente adecuado para sumergir una pipeta de 10 ml en agua hirviente. El calor matará cualquier organismo vivo en la pipeta, mientras que el peróxido matará las esporas remanentes resistentes al calor. También tengo cuidado de no poner nunca la tapa de la botella de peróxido hacia abajo a menos que esté seguro que no entrará en contacto con contaminación. Si la solución madre de peróxido se contamina con partículas vivas de moho, entonces empiezan a aparecer colonias en los cultivos de agar, no sólo en la superficie, sino también dentro del agar mismo.

Variaciones en la concentración del peróxido de fuentes comerciales

Cuando usamos peróxido, un hecho bastante molesto es que la solución que usted recibe de la farmacia o supermercado, etiquetada como que contiene 3% de solución de peróxido de hidrógeno, U.S.P., puede o no contener realmente una solución 3%. La concentración puede variar considerablemente, por encima y por debajo del 3%. Usted puede protegerse de comprar peróxido “viejo” mirando la fecha de expiración

en la botella, y si es que hay una fecha, consiguiendo una con la última fecha. (Las botellas de peróxido que yo consigo sólo muestran el mes de expiración, no el año). Sin embargo, incluso la fecha de expiración no da una seguridad absoluta de que la concentración sea realmente 3%. Por consiguiente, es importante, tener una manera de medir la concentración del peróxido en la solución. Esto puede hacerse fácilmente descomponiendo una muestra del peróxido y midiendo el oxígeno liberado, lo cual hago con la simple técnica del globo.

Aquí está mi método para hacer una medición grosera de peróxido:

Consiga un tubo de ensayo limpio (preferentemente con un borde o tapa de rosca), un pequeño globo del tipo de fiesta de cumpleaños, y una rodaja, lo suficiente pequeña para entrar en su tubo de ensayo, del tallo de cualquier hongo que usted tenga a mano (para los mejores resultados, use un hongo joven, que esté creciendo rápidamente, tome un pedazo de tallo y separe la piel natural para exponer una gran cantidad de células rotas). Si usted no tiene ningún hongo, un pedazo de banana u otra verdura sin piel servirá muy bien. También necesitará su solución de peróxido, una banda elástica, una pipeta pasteurizada, una probeta graduada de 100 ml, y una olla con agua.

- 1) Con la pipeta pasteurizada, retire 5 ml de la solución de peróxido de la botella y transfíéralo al tubo de ensayo.
- 2) Coloque la rodaja del hongo en la parte superior del tubo (todavía no permita que se resbale dentro del peróxido).
- 3) Asegúrese que el globo esté vacío de aire y estire la boca del globo por sobre de la boca del tubo (incline el tubo para evitar que la rodaja de hongo se resbale en la solución hasta que el globo esté en su lugar).
- 4) Ponga la banda elástica alrededor de la boca del globo en el tubo, para evitar que el gas escape a medida que la presión aparece (yo he encontrado más eficaz usar una banda elástica rota que puede enrollarse herméticamente alrededor de las ranuras de la rosca del tubo, por encima de la boca del globo).
- 5) Una vez que el globo está sellado en su lugar, permita que la rodaja del hongo resbale y se sumerja en la solución de peróxido. La solución debería empezar a burbujear oxígeno inmediatamente.
- 6) Agite el tubo. La solución de peróxido debería ser mayormente descompuesta en cinco a diez minutos, dependiendo de la cantidad de catalasa/peroxidasa en su rodaja de hongo.
- 7) Cuando la descomposición esté casi completa, usted verá que el burbujeo habrá disminuido y las burbujas serán muy pequeñas. Entretanto, el globo se debería haber inflado a medida que empezaba a llenarse con el oxígeno liberado.



Ahora, mi entrenamiento químico de la universidad me dice que 5 ml de una solución 3% de peróxido de hidrógeno debe generar aproximadamente 49 ml de oxígeno cuando el peróxido se descompone completamente a temperatura ambiente y a una presión de una atmósfera. Para medir el oxígeno liberado de su solución de peróxido:

- 1) Llene con agua una probeta graduada y colóquela al revés en una olla con agua y asegúrese que salgan todas las burbujas.
- 2) Retuerza el globo sobre su tubo de ensayo para atrapar el oxígeno liberado, remueva el globo del tubo sosteniendo herméticamente el extremo retorcido del globo, y póngalo bajo el agua en su olla.
- 3) Cuidadosamente libere el gas del globo en la probeta graduada invertida, desplazando el agua dentro de ella.
- 4) Manteniendo el extremo abierto de la probeta bajo el agua, lea el volumen de oxígeno en la probeta graduada.



La primera vez que hice esto, conseguí 52 ml de gas dentro de la probeta graduada desde los 5 ml de solución de peróxido. Considerando que bien puede haber habido aproximadamente 3 ml de aire en el globo “plano” antes de que yo empezara, la solución de peróxido probablemente generó una cantidad de oxígeno bastante aproximada a la cantidad teórica para 5 ml de solución 3%.

Aquí está cómo calcular la cantidad de solución de peróxido que usted necesitará, si su solución resulta ser más alta o más baja que 3%:

- 1) Divida el volumen de oxígeno esperado para 5 ml de solución 3% (49 ml si el globo está completamente vacío al comienzo, o 52 ml como en el ejemplo anterior, contando los pocos mililitros de aire atrapados en el globo inicialmente) por el volumen de oxígeno que usted realmente obtuvo.
- 2) Multiplique el número anterior por el volumen de solución del peróxido que usted agregaría a su medio o sustrato si realmente fuera una solución 3% (este volumen es dado en la sección apropiada de este manual, por ejemplo, en la sección sobre cultivo en agar, usted encontrará que usted necesitará agregar 6 ml de peróxido 3% para 1 litro de medio de agar cocinado a presión).

Es muy importante conocer la concentración precisa de peróxido cuando usted está haciendo placas de agar (vea debajo), ya que Ud. estará trabajando en las concentraciones cercanas al límite más bajo de efectividad. Cuando haga blanco de hongo, usted estará trabajando a una concentración considerablemente más alta, así que allí tendrá mucho más espacio para la variación. Yo uso menos peróxido para el sustrato en masa que para el blanco de hongo, pero allí también hay aún algún espacio para la variación. Recomiendo que usted haga la prueba del globo para verificar cada nueva botella de solución de peróxido que use para hacer la placa de agar, y verifique el peróxido que usa para hacer el blanco de hongo y el sustrato en masa por lo menos hasta que usted sepa cuán confiable es su producto local. De esa manera, sabrá con seguridad que está dando a sus cultivos la protección que usted espera. También, puede experimentar con las fuentes del peróxido en su área local

para ver quién vende el producto más confiable. Paradójicamente, el más barato puede ser mejor, porque habrá un recambio regular del estock donde el precio es más bajo. Si el peróxido no está fácilmente disponible en los negocios locales donde usted vive, probablemente podrá pedirlo a un comercio de suministros químicos. Ellos a menudo venderán solución al 30% o 35% que puede diluirse. Los negocios de suministros para piscinas de natación también pueden comercializar soluciones similares. Note, sin embargo, que estas soluciones concentradas son mucho más peligrosas que la solución estándar 3%. Lea todas las precauciones y advertencias en el recipiente y actúe de acuerdo con ellas.

Produciendo y Manteniendo Cultivos en Agar

La primera fase del cultivo de hongos es la propagación y mantenimiento del tejido del hongo (el micelio) en el agar como cultivos en placas de petri. Estos cultivos de la primera fase se usan para almacenar, propagar, y mantener las cepas de hongos en un estado saludable para la transferencia seriada, y para inocular los cultivos de la segunda fase, el blanco de hongo.

Preparando placas de agar

Hay muchas recetas para el medio de agar que pueden usarse para cultivar el micelio del hongo en placas de petri. Yo he probado varias de éstas, pero actualmente uso sólo una: un medio de malta, levadura y agar, también conocido como MYA. Este medio ha funcionado adecuadamente para cada especie de hongos que he intentado cultivar. No es tan rico como para que se contamine fácilmente, sin embargo la mayoría de las cepas crecen en toda la placa de petri de MYA en dos o tres semanas. En mi opinión, si usted está usando peróxido en su medio, no tiene mucho caso hacer que el micelio crezca algo más rápido que esto, porque ello lo obligaría a preparar más placas de agar en menos tiempo, para mantener el micelio renovado. También, después de transferir el micelio repetidamente de placa a placa, algunos cultivadores recomiendan que usted empiece nuevamente con micelio desde un cultivo en almacenamiento, para evitar problemas de senescencia (envejecimiento) del micelio. Según este punto de vista, cuanto más rápido crece el micelio, más pronto uno tiene que recurrir al almacenamiento. Si esto es verdad, convendría hacer crecer el micelio relativamente lento.

Yo mantengo todos mis cultivos en placas de petri en medio que contiene peróxido. La contaminación en placas con peróxido es rara, siempre que se sigan unas pocas precauciones, y usted no necesitará comprar un gabinete de flujo laminar o construir una caja con guantes para dejar a los contaminantes afuera. Usted puede hacer el vertido en sus placas al aire libre en su cocina, y puede mantener e incubar sus placas casi dondequiera que le guste, con tal de que el espacio esté relativamente limpio y el ambiente sea compatible con el crecimiento micelial. Sin embargo, vea mis recomendaciones al final de esta sección.

Medio MYA

Aquí está la receta que uso para un litro de medio MYA:

12 g de agar

12 g de polvo de malta liviano

1 g de polvo de levadura nutritiva

0.5 g de harina de grano (yo cambio entre trigo, centeno, maíz, arroz, avenas, y mijo)

- 0.5 g de alimento para conejo (u otro alimento para animal en pellets)
- 4-5 g pellets de madera (este número puede aumentarse para aquéllas especies que descomponen madera y que crecen pobremente en agar)
- 1 litro de agua corriente

Si usted compra la mezcla de medio MYA lista para usar en un comercio de suministros para cultivo de hongos, probablemente sólo contendrá los primeros tres ingredientes: agar, malta, y levadura. (Usted puede agregar los otros). Verifique las instrucciones del fabricante para ver cuánto polvo le recomienda que use por litro de agua. Usualmente serán unos 40 a 50 gramos. Dependiendo de la proporción de agar a polvo de malta, usted debería poder reducir la cantidad recomendada a la mitad y conseguir un medio que es realmente mejor para la salud a largo plazo de sus cultivos de hongos.

Yo preparo el medio de agar para las placas de la siguiente manera:

- 1) Agrego todos los ingredientes a un frasco con la cantidad deseada de agua. El frasco debe tener dos veces el volumen que usted realmente usará, para evitar que el agar hirviente se derrame al cocinar.
- 2) Ajusto el pH con un poco de polvo de hornear (mi agua es acídica, pero usted podría usar vinagre si la suya es alcalina. También vea mi " Nota sobre la Medición de pH del Substrato" debajo en la sección sobre cómo preparar substrato en masa).
- 3) Luego uso mi olla a presión ordinaria de cocina para fundir y esterilizar el medio. (Uso agua corriente y no he tenido ningún problema con ella. De hecho, cuando cultivé el micelio de hongo en el medio preparado con agua destilada, el crecimiento era notoriamente más lento). Coloco las tapas flojamente en su lugar y cocino a una presión de 15 psi por no más de 10 minutos, permitiendo diez minutos iniciales de producción de vapor para fundir el agar antes de colocar el regulador de presión. (Si usted está usando la mezcla MYA lista para usar, las instrucciones pueden decir que cocine a presión por tiempos mayores, por ejemplo, 45 minutos. ¡No lo haga! 20 minutos es lo máximo que usted necesita, y cualquier tiempo mayor producirá productos de caramelización en el medio que son dañinos para el micelio). También esterilizo un juego de placas de petri junto con mi medio y pongo las placas en una lata grande de tomate cubierta con lamina de aluminio (uso cajas de petri de plástico reusables, y un litro de medio alcanza para aproximadamente unas 30 placas).
- 4) Cuando la cocción está terminada, deslizo suavemente la olla fuera de la hornalla y permito que baje la presión. Retiro cuidadosamente el frasco que contiene el medio y permito que se enfríe al aire libre sobre mi mesada. No hay necesidad alguna de evitar la entrada de aire no esterilizado, asumiendo que allí no hay mucha carga de polvo, ya que el peróxido matará los contaminantes aéreos cuando sea agregado.
- 5) Cuando puedo manejar el frasco de agar cómodamente, por lo general lo pongo en una olla de agua templada para la última parte del proceso de enfriado, ya que el agar está cerca de solidificar a esta temperatura.
- 6) Entonces agrego mi solución de peróxido con una pipeta pasteurizada y rápidamente mezclo el peróxido con el medio moviendo el frasco con un movimiento circular, invirtiendo las direcciones un par de veces (pero teniendo gran cuidado en evitar hacer muchas burbujas que terminarán en la superficie de agar).
- 7) Una vez que agregué el peróxido, voy directamente a mis cajas de petri ya colocadas en una mesada limpia, y vierto el medio en las placas y cuando termino coloco las tapas.



- 8) Cuando el agar ha solidificado, pongo las placas a secar durante unos días en una bandeja ligeramente cubierta.

Para estar bien seguro con mis placas de cultivo, uso la concentración más baja de peróxido que he encontrado eficaz para el medio de agar, que es aproximadamente 0.018% o 6 ml de solución 3% de peróxido por litro de medio. (Usted puede duplicar esta cantidad sin daño visible al micelio de las especies que he cultivado, pero tenga en cuenta que las especies de lento crecimiento tales como *Stropharia*, pueden ser más sensibles a la exposición al peróxido. La producción de enzimas de protección que descomponen peróxido parece ser groseramente paralela a la velocidad de crecimiento del organismo). Cuando la placa es inoculada, la concentración probablemente empieza a caer lentamente debajo del nivel inicial a medida que el peróxido es descompuesto por el micelio que se está extendiendo. Eventualmente, el peróxido desaparecerá completamente cuando el micelio esté agotando el agar, sino antes. Una vez que esta fase se alcanza, las colonias de moho pueden empezar a aparecer en el borde de las placas de agar.

Medio de agar sin presión

Si usted no posee una olla a presión, o no quiere usar una, usted aún puede hacer placas de agar apropiadas por exposición del medio de agar a ebullición / vapor fluyente, con tal de que altere un poco la receta anterior. Usted necesitará reemplazar los ingredientes que contengan enzimas que descomponen el peróxido con otros ingredientes que no contengan esas enzimas. En la receta anterior, el agar, el polvo de malta, y el pellet combustible no contienen enzimas que descomponen peróxido. Pero el polvo de levadura, harinas y alimento para conejo si las contienen. Para usar peróxido en nuestro medio de agar, ordinariamente tenemos que cocinar el medio a presión para destruir las enzimas que descomponen peróxido en éstos ingredientes. Sin embargo, en su lugar pueden usarse otros ingredientes. La levadura en polvo

proporciona vitaminas, de manera que este ingrediente puede ser reemplazado por un pedacito de una píldora sintética de vitaminas del complejo B. Debido a que es sintética, no contendrá enzimas. La harina de grano y el alimento para conejo proporcionan una fuente de proteína/nitrogeno, de manera que éstos ingredientes deberían ser reemplazados por otras fuentes de proteína compatibles con el peróxido. Típicamente, sólo las sustancias altamente procesadas están libres de enzimas que descomponen el peróxido, sustancias como gelatina, el polvo de leche de soja, polvo de leche no grasa, salsa de soja baja en sodio, etc. Para detectar la presencia de enzimas, mezcle un poco de la sustancia en cuestión con algo de la solución 3% de peróxido y vea si hay evolución de burbujas. Ausencia de burbujas significa que usted está en lo cierto.

Aquí entonces hay una receta para un litro de medio de agar "Sin presión":

12 g agar

12 g polvo de malta liviana

0.5 g de fuente de nitrógeno procesada (rote entre la gelatina, polvo de leche de soja, leche en polvo, salsa de soja baja en sodio, etc.)

4-5 g pellets de madera combustible

pequeños trocitos (¿0.1 g? suficiente para que la solución se torne ligeramente amarilla) de la píldora de vitaminas del complejo B

1 litro de agua limpia, libre de partículas

- 1) Permita que el frasco que contiene este medio (y la placa de petri, si es reusable) se asienten en el agua hirviente en una olla cubierta con una tapa pesada por aproximadamente 45 minutos, lo cual es suficiente tiempo para fundir el agar y matar cualquier organismo vivo en el medio (puede ser aconsejable exponer las cajas de petri reusables a vapor fluente por un tiempo mayor).
- 2) Luego retire el frasco y permita que se enfríe, agregando el peróxido como en la primera receta. El peróxido matará cualquier espora que permanezca en el medio. Yo agrego ligeramente más peróxido a las placas no autoclavadas, unos 8 ml por litro de medio. En general, encuentro que las placas no autoclavadas conteniendo peróxido se contaminan más a menudo que las placas con peróxido autoclavadas, pero aún así se comportan mucho mejor que las placas hechas sin el peróxido.

Tenga cuidado con los goteos del medio de agar que aterrizan sobre el exterior de sus placas de petri. Si éstos no se limpian, crecerán mohos en unos días, y las esporas difundirán en las placas y comenzarán a germinar en el borde exterior de agar.

Si usted está trabajando con cajas de petri reusables como yo lo hago, límpielas cuidadosamente después de sacar el agar viejo. Incluso la cantidad más pequeña de medio viejo dejado en una placa, si no está en contacto con el peróxido del nuevo agar la próxima vez que usted use la placa, puede permitir el crecimiento de moho y volverse un punto de partida para la contaminación.

Un beneficio de verter el agar frío en las placas, es que hay considerablemente menos condensación en el interior de las tapas, que si usted lo vierte caliente. Esto obviamente significa que usted no tendrá que tomar medidas especiales para librarse de la condensación, como agitar las tapas, o entibiar las placas para evaporar las gotas. Y usted podrá ver mejor qué está pasando en sus placas. Sin embargo, la superficie de agar todavía necesita algún secado, por lo que antes usarlas permita que las placas permanezcan a temperatura ambiente durante un día, cubiertas ligeramente con una hoja de papel encerado para preservarlas del polvo exterior. Las placas con medio de agar que se han colocado en vapor fluente estarán más húmedas

que las placas con medio que ha sido cocinado a presión, debido a las temperaturas de cocción más bajas y al tiempo de cocción más corto, por lo que necesitarán ser secadas durante un tiempo más largo.

Si usted tiene medio de agar extra después del vertido en sus placas, el excedente permanecerá estéril guardado en el refrigerador. Cuando usted lo necesite, puede fundir el agar de nuevo, pero note que usted necesitará agregar peróxido de nuevo, porque el calor de fusión habrá destruido lo que usted agregó la primera vez.

Adquiriendo cultivos de hongos

Hay varias maneras de adquirir un cultivo de micelio de hongos para que crezca en su placa de agar. Pueden germinarse esporas de un hongo en medio nutritivo. El tejido de un hongo fresco puede cortarse asépticamente y ponerlo a producir micelio en agar nutritivo. O se puede comprar un cultivo de tejido de hongos a un proveedor comercial, usualmente en un tubo de agar o en placa de petri.

Debido a que el medio nutritivo que contiene peróxido mata las esporas de los hongos, yo no he trabajado en germinar esporas para obtener cultivos de hongos. En cambio, prefiero comprarlos a un proveedor confiable. La manera en que yo lo veo, es que el proveedor ya ha ido a través del problema de aislar una cepa de hongos con características deseables, y comprando el cultivo de tejido, estoy relativamente seguro de obtener un micelio que lleve las mismas características deseables. En contraste, si usted intenta cultivar una cepa de hongos que usted ha aislado de esporas o clonado y no fructifica, entonces usted no sabrá si lo que está causando el problema son las condiciones que usted está proporcionando, o la cepa. (Las esporas son como las semillas: ellas pueden o no tener las mismas características genéticas del genitor). Y usted puede gastar cantidades enormes de tiempo intentando fructificar una cepa sin valor. Peor aún, una vez que usted ha desarrollado las condiciones para hacer crecer el micelio en su situación, si alguna vez pierde el cultivo, a menos que lo haya comprado a un proveedor comercial, usted no puede regresar al mismo proveedor y obtener otra "copia". Usted tendrá que volver a empezar y comenzar todo de nuevo y elaborar de nuevo las condiciones para una nueva cepa.

Cuando usted compra un cultivo de tejido a un proveedor comercial, generalmente se entiende que usted lo usará para cultivar --y vender si usted así lo decide-- blanco de hongo, cultivos en fructificación y cuerpos fructíferos de la cepa de ese hongo. También se presume que usted no tomará ese cultivo y lo usará para establecer su propio banco de cepa comercial, vendiendo cultivos en agar a terceros. Si usted quiere vender cultivos en agar, la ruta ética es aislar sus propias cepas por clonación de hongos recogidos en la naturaleza o germinando esporas.

Clonación de hongos

Sin embargo, puede ser divertido clonar su propio cultivo de hongo de un espécimen que usted encontró en la naturaleza. Quizás le proporcionará una cepa con una fructificación de primera. Si le gustase intentarlo, necesitará algunas placas de agar nutritivo conteniendo peróxido (vea debajo), un bisturí, una lámpara de alcohol etílico, y un hongo fresco.

Para clonar un hongo:

- 1) Limpie la superficie externa para que no haya ninguno residuo suelto.

- 2) Rompa abriendo el “sombrero” del hongo (o base del tallo) tan limpiamente como usted pueda.
- 3) Prenda su lámpara de alcohol y flamee la hoja de su bisturí. Entonces corte un pequeño pedazo de tejido limpio del interior del hongo que no esté en contacto con la superficie externa. Esto será obviamente más fácil con los hongos gruesos y carnosos que con los delgados.
- 4) Cuando tenga el pedazo de hongo en su bisturí, transfíralo al centro de una de sus placas de agar nutritivo. Ya que las oportunidades de fracaso son altas, si usted puede tome unos cuantos pedazos más y transfíralos cada uno a su propia placa de agar.
- 5) Finalmente, apile las placas, envuélvalas en una bolsa de plástico limpia, y póngalas en un lugar conveniente para incubar a temperatura ambiente.
- 6) el crecimiento micelial, si ocurre, debe hacerse visible en unos pocos días, extendiéndose hacia afuera del trozo de tejido del hongo. También pueden crecer mohos o bacterias en cuyo caso usted tendrá que recortar un pedazo de micelio limpio y transferirlo a una placa nueva. Si usted decide subclonar el micelio para separarlo de los mohos contaminantes de esta manera, asegúrese de hacerlo antes de que el moho haya madurado lo suficiente como para oscurecer en color y formar esporas. De lo contrario usted simplemente estará transfiriendo moho con el micelio.

Si usted está intentando clonar micelio de hongos silvestres, recuerde que el peróxido de hidrógeno en el medio de cultivo no eliminará por sí mismo los contaminantes residentes en el micelio. Si el hongo que quiere clonar está sucio, y usted no puede conseguir un pedazo de tejido limpio abriendo el tallo o el sombrero, el peróxido en el agar no mejorará las cosas. No es un esterilizante. Sin embargo, si su material está básicamente limpio, el peróxido en su agar por lo menos reducirá la incidencia de la contaminación de fondo en sus placas de clonado.

Almacenamiento de la cepa

Una vez que usted ha adquirido el cultivo de un hongo, necesitará una manera para preservar muestras del cultivo en forma segura por períodos largos, de manera que usted pueda recurrir a estas muestras conservadas si algo le pasa al cultivo activo que usted usa todos los días. El método del almacenamiento que yo uso simplemente requiere extraer por raspado un pedazo de micelio de una placa de agar y transferirlo a un tubo con tapa a rosca conteniendo agua destilada estéril (gracias a Joe Kish por llamar mi atención sobre esta técnica). Una vez en el agua destilada, el micelio del hongo se vuelve dormante y para algunas cepas durará indefinidamente (en mi experiencia los hongos del tipo ostra duran sólo aproximadamente un año). Ni siquiera se requiere refrigeración.

Aunque los tubos con agar en “pico de flauta” (inclinado) son la manera “tradicional” de almacenar cultivos para aquéllos que no tienen nitrógeno líquido, en realidad no conserva las cepas por mucho tiempo --seis meses a lo sumo.

Ahora, cuando usted tenga que hacer las preparaciones de las cepas que quiere conservar por mucho tiempo en almacenamiento, recomiendo que las prepare sin recurrir al peróxido de hidrógeno. La razón de esto es que no conozco realmente los efectos que la exposición al peróxido por largo tiempo pueda tener sobre los cultivos de hongos en almacenamiento. Podría acelerar la senescencia? ¿Debilita gradualmente las cepas? Hay allí cambios genéticos graduales? Simplemente, no puedo descartar todos los problemas que pudieran ocurrir con todas las diferentes especies que usted pueda querer almacenar. Además, los cultivos que están en

crecimiento activo pueden defenderse mejor contra el peróxido que los cultivos dormantes –inactivos- en almacenamiento, los cuales pueden ser más propensos a daño. De modo que, aunque los medios con agar inclinado y los tubos con agua destilada pueden prepararse fácilmente con peróxido, el almacenamiento de cepas en medio libre de peróxido es el camino más seguro. Además, es tan fácil preparar buenos tubos de almacenamiento de agua destilada agregando el agua destilada a los tubos, enroscando ligeramente las tapas, y luego cocinando a presión, por una media hora (si usted no tiene una olla de presión, yo probaría hervir en agua durante una hora con unas gotas de peróxido 3%; el peróxido matará las esporas resistentes al calor, y luego la ebullición prolongada destruirá el peróxido). Y a diferencia de las cajas de petri, los tubos de tapa a rosca pueden flamearse luego de abrirse y antes de cerrarse, resultando más fácil mantenerlos estériles sin filtración de aire mientras se inserta el micelio. Finalmente, yo envuelvo los tubos de almacenamiento de micelio en bolsas del tipo de las que se usan para guardar alimentos, de plástico transparente, antes de ponerlos en lugar seguro en mi sótano.

Inoculando y manejando cultivos de agar

Yo inoculo la placa de agar y los tubos picos de flauta usando un bisturí que esterilizo con la llama de mi lámpara de alcohol, para transferir a cada placa o tubo un trocito pequeño de agar impregnado de micelio cortado de una placa que tiene un saludable halo de micelio creciendo en ella.



Para usar un bisturí flameado, primero lo enfrío hundiéndolo en el agar de la placa que contiene el cultivo que quiero transferir. (Tradicionalmente, usted enfriaría el bisturí hundiéndolo en el agar nuevo, de una placa sin usar. Pero el bisturí caliente puede descomponer algo del peróxido en el sitio del corte. Entonces en aire no filtrado, este sitio podría convertirse en una zona de crecimiento de contaminantes, ya que queda menos protegido. Éste no es un problema con la placa de la cual retiro los trozos de agar para inocular, ya que será desechada. Pero puede ser de consideración con la placa nueva. Así que yo enfrío el bisturí en la placa vieja).

Si usted está inoculando una placa desde un cultivo de almacenamiento desprovisto de peróxido, no use un ansa de inoculación excepto para pescar un trozo grande de micelio. En mi experiencia, los fragmentos miceliales menores recogidos por un ansa de inoculación no son suficientes para establecer fácilmente colonias en presencia de concentraciones de peróxido que son eficaces contra los contaminantes, sobre todo cuando el cultivo no ha estado creciendo previamente en peróxido. El micelio tiene mucho mejor oportunidad de prenderse si usted puede transferir un trozo de micelio desde un tubo de almacenamiento con agua destilada, o un trozo de agar que contiene

micelio cortado de un agar inclinado usando un bisturí u otro instrumento afilado estéril. (Debo admitir que es un poco complicado y a veces frustrante obtener con un bisturí pedazos de agar desde un agar inclinado).

Los cultivos que no se han expuesto previamente al peróxido a menudo se retrasarán al principio, ya que el micelio debe ajustarse a esta nueva característica de su ambiente. A veces, al principio el micelio parecerá estar intentando crecer para alejarse de agar con peróxido. (Usted puede observar la misma conducta al transferir desde una placa que originalmente contuvo peróxido pero donde el micelio ha sobrecrecido por unos días de manera que todo el peróxido agregado se ha descompuesto). Más tarde o más temprano, sin embargo, el micelio se establecerá y crecerá normalmente sobre la superficie del nuevo medio.

Con mis cepas, nunca observé problemas que yo pudiera atribuir a una exposición continua al peróxido. Típicamente, transfiero mis cepas aproximadamente diez veces en medio que contiene peróxido antes de volver a los cultivos en almacenamiento libres de peróxido, aunque es arbitraria la opción de diez transferencias, y volver a los cultivos en almacenamiento puede no ser en absoluto necesario.

Note que el peróxido protege sólo la porción de la placa de agar que no tiene micelio creciendo sobre ella. El micelio mismo está indefenso, ya que va descomponiendo el peróxido a medida que crece. Por consiguiente, las placas de cultivo más viejas cuyo micelio ha sobrecrecido por más de unos días tienen una probabilidad mayor de albergar contaminantes.

Previene la contaminación oculta con la inoculación en el fondo

También es posible que los contaminantes se acumulen sobre el micelio si usted transfiere repetidamente en aire no filtrado, aun cuando siempre haya peróxido en el agar y el micelio nunca cubra la placa entera. Aunque nunca pueda ver los contaminantes creciendo en el micelio del hongo en sus placas, los contaminantes invisibles irán apareciendo lentamente. Esta "contaminación oculta" puede ser un problema ya sea que usted esté usando o no el peróxido en su blanco de hongo y también en su substrato para fructificación. Sin embargo, si su blanco de hongo o substrato para fructificación estuvieran libres de peróxido, hay todavía una oportunidad mayor para que los contaminantes ocultos puedan desarrollarse cuando ellos entren en el medio sin protección.

Para evitar la posibilidad de tal contaminación oculta, uso un simple truco: cuando hago mis transferencias inoculo regularmente el fondo de agar (Qué tan a menudo debe hacer esto depende de cómo usted guarda sus placas, y por cuánto tiempo. El curso más seguro es realizar esta operación en cada transferencia, por lo menos con esas placas que se usan para transferir micelio a las placas subsecuentes. Pero usted puede aplazar esa tarea por dos o tres transferencias antes de que empiece afectando su proporción de éxito). Realizo la inoculación en el fondo como sigue:

- 1) De vuelta la placa al revés.
- 2) Levante un lado del fondo de la placa como si estuviera con bisagra, y usando un bisturí flameado separe suavemente el disco de agar y apóyelo en la tapa de la placa. (Si su agar habitualmente "lagrimea" o se rompe en este paso, usted necesitará aumentar la cantidad de agar al hacer su medio).
- 3) Cierre la placa dada vuelta hasta que usted esté listo, entonces transfiera un trozo de micelio a la parte inferior expuesta de agar con un bisturí flameado y enfriado.

- 4) Finalmente, después de inocular la parte inferior, cierre la placa, vuélvala al lado correcto de nuevo, y suavemente coloque (de nuevo con la ayuda de un bisturí flameado) el disco de agar a su posición usual en el fondo de la placa, ahora asentándose encima del trozo de micelio.

Este arreglo obliga al micelio a crecer desde el fondo del agar a través del medio a la superficie de la placa, dejando detrás en este proceso a cualquier contaminante acumulado. Ciertas cepas pueden no responder bien a este arreglo, pero hasta ahora yo no he tenido ningún problema siempre que la cepa fuera capaz de crecer vigorosamente en el medio. Sin embargo, debido a la cantidad de manipulación involucrada, este procedimiento lleva un mayor riesgo de contaminación comparado con las transferencias simples. Considerando que raramente veo contaminación en placas con peróxido inoculadas de la manera usual hasta que ellas son viejas, pierdo quizás una de cada cinco placas inoculadas en la parte del fondo del agar. La limpieza de la mesada y de sus dedos con alcohol para desinfectar antes de que usted empiece, puede ayudar a disminuir tales fracasos.

Un punto a tener muy en cuenta en el procedimiento de la inoculación en el fondo es evitar raspar trocitos de agar hacia el borde de la parte inferior de la placa de petri cuando usted cierra la tapa después de inocular el fondo de agar. Los trocitos de agar que quedan en el borde, o afuera de él, tienden a hacer crecer contaminantes debido a su proximidad al aire del ambiente. También es aconsejable usar placas que han sido secadas suficientemente para eliminar goteos de la superficie. Si el agar todavía está muy húmedo cuando se lo empuja dentro de la tapa, puede ir dejando suficiente medio en la tapa como para después causar problemas en los bordes de la placa.

Un punto final: Esté seguro de no cortar hasta el fondo a través de agar cuando usted retira cuñas para inoculación desde una placa inoculada en el fondo. Haciendo eso anulará el propósito entero del procedimiento, trayendo los contaminantes ocultos que nosotros estamos intentando confinar al fondo de la placa. Para dejar estos contaminantes detrás, corte sólo cuñas de la parte superior de agar.

Una vez que mis placas de agar han sido inoculadas (conservo cuatro al mismo tiempo de cada cepa), las coloco dentro de bolsas nuevas de plástico transparentes del tipo de guardar comida, las que cierro con tiras de torsión (pequeños alambres forrados en plástico). La bolsa cerrada proporciona un ambiente de aire sin movimiento y ayuda a mantener afuera a las mosquitas y ácaros merodeadores del hongo. Coloco tres o cuatro placas de petri en una sola bolsa. Ellas pueden entonces incubarse en cualquier parte que resulte conveniente -- en un estante, en un armario, en la superficie de una mesada, etc. Sin embargo, no recomiendo mantener las placas en la heladera, debido a la condensación que se produce, y tampoco recomiendo incubar las placas en un estante sobre un calefactor, porque los ciclos de activación y parada de calefacción y enfriado causarán que los contaminantes sean dirigidos a sus placas.

La capacidad de poder mantener fácilmente placas nuevas (no inoculadas) es uno de los beneficios del peróxido. Yo mantengo un juego de placas nuevas guardadas en un sitio fresco, no el refrigerador. Como en el caso de las placas inoculadas, guardo éstas envueltas en bolsas plásticas para guardar alimentos. Cada vez que uso uno de mis cultivos en crecimiento para inocular substrato para hacer blanco de hongo, también saco una de esas placas nuevas y la inoculo para reemplazar el cultivo que he usado. Al mismo tiempo, reemplazo cualquier cultivo que pueda haber desarrollado colonias de moho en el borde. De esta manera, el número de placas que tengo creciendo permanece constante, y raramente encuentro que me falten.

Haciendo Blanco de Hongo

La producción de blanco de hongo es la segunda fase en el proceso de cultivar hongos. El blanco es el "iniciador" que se usa para inocular substratos en masa para fructificar, o para hacer más blanco de hongo. Tradicionalmente, su producción se dejaba a los proveedores comerciales de blanco de hongo que tenían los medios estériles para preservar al blanco libre de contaminantes. Sin embargo, con el desarrollo del método del peróxido, la producción de blanco de hongo es simplemente otro paso y bastante fácil en el proceso de producción de hongos.

Ser capaz de poder hacer el propio blanco de hongo sin una facilidad estéril tiene un beneficio económico significativo para el pequeño cultivador o aficionado. A un precio de 40 a 50 dólares por unos pocos kilos de blanco de hongo, comprar el blanco de hongo representa un gasto significativo. Si usted hace esos mismos pocos kilos con la ayuda del peróxido, el grano le costará alrededor de dos a cuatro dólares, y el peróxido-- 20 centavos. (El aserrín, si no es gratis, le costará mucho menos que el grano). Y usted no tendrá que gastar una pequeña fortuna en la construcción de una estructura de filtración de aire o disponer de cuartos limpios especiales para incubar el blanco de hongo.



(Blanco de Hongo de diez Minutos en un estante).

Para mi propia producción de hongos, he optado casi completamente por usar blanco de hongo basado en aserrín. Con mis métodos actuales, el medio para el blanco de hongo basado en aserrín se puede ser preparar más rápida y fácilmente que el blanco de hongo en grano, sin tener que sumergir el grano, e incluso sin autoclavar o esterilizar a presión (vea debajo). También, el blanco en aserrín maduro coloniza más rápidamente el substrato de hongo basado en aserrín, y en mi experiencia, con una menor incidencia de contaminación por mohos, que el blanco de hongo en grano. Y la contaminación del propio blanco de hongo es rara, quizás un frasco en cien, como

simplemente podría esperarse de los errores ocasionales, inevitables en la técnica. Es cierto que el blanco de hongo en aserrín no contribuye tanto en la nutrición del sustrato en masa como lo hace el grano, pero no es particularmente difícil agregar la nutrición faltante directamente al sustrato desde otras fuentes que no requieren cocinar a presión.

Para la mayoría de las especies de hongos, el blanco de hongo en grano se recomienda para sustrato de paja, ya que el grano hace un aporte a la base nutritiva del sustrato. Y ese grano tiene que ser esterilizado a presión. Hay todavía, dos buenas especies que crecerán bien en paja usando blanco de hongo basado en aserrín en lugar de grano: *Hypsizygus ulmarius* (la ostra del olmo) y *Hypsizygus tessulatus* (Shimeji). Ya que el *H. ulmarius* crece muy fácilmente y sabe considerablemente mejor que los hongos ostra tradicionales de la familia *Pleurotus*, no puedo encontrar ninguna razón para incurrir en la dificultad adicional de fabricar el blanco de hongo en grano simplemente para crecer hongos ostra en la paja.

"Blanco de hongo de diez minutos"

Mi procedimiento propio para preparar blanco de hongo basado en aserrín requería originalmente esterilizar en forma separada suficiente agua para agregar peróxido diluido al blanco de hongo después que había sido cocinado a presión y enfriado. Éste es como mucho un procedimiento algo complicado, de manera que busqué alternativas. Mi búsqueda condujo al desarrollo de "blanco de hongo de 10 minutos", una forma de blanco de hongo hecho en pellets de papel y aserrín que sólo requiere una cocción al vapor de diez minutos y ninguna cocción a presión en absoluto. Probablemente éste sea el método más rápido que existe para preparar blanco de hongo basado en aserrín. En este procedimiento de "un paso", todos los ingredientes sólidos se ponen en un frasco, entonces se agrega el peróxido con toda el agua, y todo se cuece brevemente al vapor y se enfría. Evidentemente, hay suficiente peróxido que sobrevive a la breve cocción al vapor para preservar al blanco de hongo libre de contaminación.

Aquí está la receta para hacer el "blanco de hongo de diez minutos":

Pellets combustibles de madera (42.5 g, o aproximadamente 4 cucharas)

Pellets de fibra de papel (85 g, o aproximadamente 1/2 taza más 1 cuchara)

Caliza molida (0.4 g, o aproximadamente 1/4 cucharita)

Yeso (optativo) (0.4 g, o aproximadamente 1/4 cucharita)

Suplemento de nitrógeno - 2% en peso (vea debajo) - (usualmente un total de 3/4 cuchara).

Agua caliente - 150 ml, mezclada con 20 ml de peróxido de hidrógeno 3%.

Frasco con tapa conteniendo un disco ajustado de cartón (vea debajo bajo "Recipientes para el blanco de hongo ")

- 1) Coloque en un frasco de unos 750 cm³ o de tamaño similar los pellets combustibles de madera (el aserrín ordinario NO servirá), pelotillas del papel (Crown™ Animal Bedding or el Good Mews™ Cat Litter, etc.), cal, yeso (optativo) y el suplemento de nitrógeno (vea debajo). Las pellets combustibles deben estar hechos de una madera relativamente blanda, como álamo o abeto, que se desintegran fácilmente y que se calientan y enfrían rápidamente. La cal hidratada, que es hidróxido de calcio en polvo, puede sustituir a la piedra caliza, pero use solamente 1/8 de cucharita.
- 2) Agregue el agua caliente con peróxido al frasco, y mezcle ligeramente.

- 3) Después de permitir unos minutos para que el líquido se absorba y que los pellets combustibles de madera se desintegren, agite el frasco (tapado con una tapa provisoria) para mezclar los ingredientes, luego golpee el frasco en una superficie mullida para desalojar el sustrato de la parte superior del frasco y volverlo con el resto del sustrato.
- 4) Humedezca ligeramente el disco del cartón de la tapa definitiva y ponga la tapa flojamente en su lugar en el frasco.
- 5) Ponga el frasco en una olla que contenga aproximadamente 1,25 a 2,50 cm de agua, cubra la olla con una tapa ajustada, lleve a la temperatura de ebullición, y cocine durante solo diez minutos en un hervor activo. (Yo quiero que la olla alcance la temperatura de ebullición rápidamente, entonces empiezo con agua caliente de la canilla. Los frascos se asientan en una rejilla que los eleva ligeramente del fondo).
- 6) Cuando se han alcanzado los diez minutos, retire el frasco y permita que se enfríe rápidamente a temperatura ambiente.
- 7) Humedezca el disco del cartón dentro de la tapa del frasco con un poco de peróxido 3% vertiendo un poco de la solución y moviendo la tapa para extender el líquido. Vierta afuera cualquier exceso y enrosque la tapa en el frasco.
- 8) El sustrato para hacer blanco de hongo está entonces listo para inocular.

En el procedimiento anterior, yo mezclo una parte de aserrín con aproximadamente dos partes de papel pelletizado. Los pellets permiten que el blanco de hongo se separe en los frascos al agitar después que el micelio ha crecido a través del sustrato. Por supuesto, usted también puede preparar su blanco de hongo de aserrín en bolsas de plástico resistentes al calor, y entonces usted no necesitará pellets de papel, ya que puede separar el blanco de hongo manipulando la bolsa.

Por sí mismo, el micelio crecido en agar coloniza el aserrín con dificultad y por eso en el procedimiento he agregado una fuente de nitrógeno adicional a mi blanco de hongo de aserrín. La receta estándar requiere una parte de salvado por cada cuatro partes de aserrín, pero si usted usa cualquier suplemento "crudo" tal como salvado, tendrá que esterilizar a presión su blanco de hongo después de todo, para eliminar las enzimas que descomponen peróxido. Pero yo he identificado varios suplementos de nitrógeno que no requieren esterilización a presión.

Dos opciones fácilmente disponibles son la leche de soja y la leche de vaca en polvo. Yo he usado con éxito cada una de estas sustancias en la receta anterior para el blanco de hongo de 10 minutos agregando 8,5 g (o un poco menos de una cuchara) a las cantidades especificadas de pellets de fibra de papel y pellets combustibles de madera.

La Corporación Sylvan vende dos suplementos procesados, uno basado en proteína de soja desnaturalizada (Millichamp 3000), y el otro basado en gluten de maíz (CG60), y éstos sirven al propósito bastante bien (yo agrego 8,5 g en la receta anterior para el "blanco de 10 minutos"). Ninguno de estos suplementos comerciales cuando son frescos descomponen al peróxido, pero el Millichamp 3000 envejecido y un tercer suplemento de Sylvan, el CS36, sí lo hacen.

El fertilizante artificial también puede proporcionar una fuente de nitrógeno apropiada (por ejemplo, aproximadamente 2,85 g de la marca "Schultz Instantáneo" de fertilizante 20-30-20 anda bien en la receta anterior). Yo he usado esto con éxito con *P. eryngii* y *H. ulmarius*. Sin embargo, debe saber que el micelio de hongo tarda algún tiempo en adaptarse a tales compuestos químicos, por lo que el crecimiento empezará bastante lentamente.

Quizás no le guste la idea de usar fertilizante artificial. Bien, ya que la orina humana contiene nitrógeno principalmente en forma de urea, puede usarse como un suplemento orgánico en lugar del fertilizante. En ese caso, a grosso modo podría reemplazar la mitad del agua requerida con orina nueva.

En el caso de usar otros suplementos, la idea es agregar suficiente para llevar el nitrógeno en el medio del blanco de hongo a aproximadamente 0,4 %, o la proteína a aproximadamente 2,5 %. Para los detalles para hacer este tipo de cálculo vea la sección sobre suplementos bajo el título preparación de sustrato en masa.

Dos notas finales en este procedimiento de blanco de hongo de 10 minutos: primero, tenga cuidado de usar recipientes e instrumentos limpios, use sólo agua limpia, libre de materia particulada, y si usted está trabajando en una cocina, asegúrese que no haya partículas de harina, o de cualquier otra materia orgánica en los frascos o en los recipientes que usa para pesar el medio. También, asegúrese que ninguno de sus ingredientes (o sus discos de cartón para las tapas) sea tan viejo que haya tenido oportunidad de humedecerse y empiece a descomponerse. Esto introducirá contaminantes vivos que contienen enzimas activas que descomponen el peróxido. La técnica funciona siempre que no haya enzimas que descomponen peróxido en cualquiera de los ingredientes, de modo que usted necesitará asegurarse que esto sea así.

Segundo, el procedimiento también funciona porque la pequeña cantidad de material que estoy usando para un frasco de aproximadamente _ litro puede ser calentada y enfriada rápidamente, de manera que algo del peróxido permanece intacto después del tratamiento con vapor. Cantidades más grandes de sustrato para blanco de hongo tomarán mucho más tiempo tanto para calentarse como para enfriarse, por lo que probablemente requerirán el agregado de cantidades mayores de peróxido para asegurar que algo sobreviva. Usted tendrá que realizar sus propios experimentos para determinar la cantidad de peróxido a agregar.

Blanco de hongo en aserrín esterilizado a presión

Si usted no va a usar pellets combustibles de madera como una fuente de aserrín, o si usted quiere usar un suplemento de nitrógeno no procesado como el salvado, usted tendrá que esterilizar su blanco de hongo de aserrín a presión, y agregar peróxido diluido al medio después que se ha enfriado. Usted deberá esterilizar aparte suficiente agua para diluir el peróxido en aproximadamente un tercio a un medio del total de agua a agregar al sustrato. Después de medir el peróxido diluido que usted necesita, viértalo en el medio del blanco y entonces agite bien para distribuir el líquido.

Aquí está el procedimiento cómo yo acostumbro a hacerlo:

- 1) Agregue aproximadamente la mitad del agua total que usted necesitará al medio del blanco de hongo, en tantos recipientes como usted quiera preparar.
- 2) Mida y esterilice suficiente agua correspondiente a la otra la mitad del total de agua, con peróxido, para agregar a cada los recipiente.
- 3) Diluya su peróxido en agua estéril cuando esté fría, para una dilución 1 en 10 (es decir, agregue un volumen de peróxido 3% que sea aproximadamente una décima parte del volumen total del agua).
- 4) Mida las cantidades individuales de agua para cada recipiente de blanco de hongo en una probeta graduada pasteurizada con agua hirviente.
- 5) Vierta el agua medida en cada recipiente del blanco de hongo (resultando en una dilución adicional 1 en 2, porque los recipientes ya contenían la mitad del agua)

asegurándose de limpiar los goteos que corren debajo por el exterior de la probeta para que no entren en el blanco de hongo durante el vertido, y mezcle inmediatamente. La dilución total viene a ser aproximadamente de 1 en 20, que equivale a una concentración de peróxido de aproximadamente 0,15 %, la misma que para el blanco de hongo en grano.

Blanco de hongo en grano

Ahora, si usted ha decidido que necesita blanco de hongo en grano, tengo que advertirle --sobre todo si nunca antes ha hecho blanco de hongo en grano-- que prepararlo puede ser difícil incluso con peróxido agregado. Esto se debe a que el grano disponible localmente puede contener una alta carga de contaminantes endógenos que no se pueden eliminar eficazmente por la cocción a presión.

De manera que, aunque he empleado períodos largos de esterilización y mucho peróxido, no he sido capaz de hacer en forma consistente blanco de hongo de centeno libre de contaminación con el grano de centeno que consigo localmente. Afortunadamente, he podido sustituirlo con un grano llamado trigo blanco blando. Tiene un contenido de humedad inicial mucho más alto que los centenos rojizos (rye berries) (30% vs 8%), pero por alguna razón está mucho más limpio que el centeno que puedo conseguir. El trigo blanco blando ha funcionado bien cuando le he agregado una cantidad medida de agua caliente y permitido que permanezca toda la noche antes de la decocción a presión, o cuando he remojado el grano con exceso de agua caliente. Con este grano siempre obtengo blanco de hongo en grano libre de contaminación. Desgraciadamente, el trigo blanco blando a veces no está disponible, y los comerciantes son proclive a mezclarlo con trigo rojo duro, un grano de baja humedad que me da los mismos problemas que el centeno.

Cualquiera sea el grano que usted escoja, deberá estar seguro que 1) su substrato está completamente esterilizado antes de que usted agregue el peróxido, y 2) ha quitado todos los rastros de medio del exterior de sus recipientes.

Por supuesto, el problema de una completa esterilización también existe preparando blanco de hongo en ambientes de aire filtrado. Si hay esporas de moho o bacterias dentro del grano mismo o de otras partículas de substrato, y las esporas no son eliminadas por autoclavado/decocción a presión, ellas pueden germinar y estropear el blanco de hongo a pesar del aire filtrado o del agregado de peróxido. Además, con el peróxido, una incompleta esterilización significa también que algunas enzimas que descomponen peróxido quedan en el grano dejando zonas de medio que no están protegidas por peróxido.

El segundo problema también existe en la práctica del cultivo convencional. Si quedan rastros del medio de cultivo en el exterior de los recipientes de cultivo, estos pedacitos de medio pueden convertirse en sitios para el crecimiento de contaminantes y la dispersión de esporas. Si esto pasa con substrato protegido con peróxido, el cultivo permanecerá a menudo limpio hasta que sea agitado para distribuir el micelio. Pero unos pocos días después los contaminantes proliferarán tomando ventaja de la falta de protección del peróxido en las nuevas zonas de crecimiento micelial. Este problema puede prevenirse limpiando cuidadosamente los recipientes reusables, por dentro y fuera, antes de usarlos, y limpiando los exteriores de los recipientes con alcohol de desinfectar después que el blanco de hongo ha sido inoculado.

Aquí está cómo hago el blanco de hongo de trigo blanco blando:

- 1) Peso 200 g de grano en un frasco de 3/4 litro,
- 2) Luego agrego un exceso de agua caliente de la canilla y una cantidad diminuta de polvo de hornear para disminuir la acidez de mi agua corriente.
- 3) A continuación, sumerjo el grano a temperatura cercana a ebullición por una hora o dos para embeber los granos, drenando el exceso de agua cuando el grano tiene alrededor del doble en volumen.
- 4) Finalmente, esterilizo el frasco con grano en una olla a presión durante una hora. La duración exacta de tiempo que usted use dependerá de su grano y de la olla a presión.
- 5) Cuando el frasco se ha enfriado, agrego 10 ml de peróxido de hidrógeno 3% (o 20 ml de peróxido por cada 450 g de grano inicialmente agregados), y agito bien para cubrir el grano.

Un cultivador agrega a su peróxido colorante permitido para alimentos, para poder ver si ha conseguido distribuir completamente el peróxido en el grano. (Si su grano se aglutina demasiado, será difícil cubrir completamente los granos, de manera que tome la precaución de ajustar su contenido de agua, y no sumerja o cocine su grano demasiado tiempo).

La concentración del peróxido final es alta, aproximadamente 0.15%, pero el micelio del hongo todavía crece bien, si bien algo más lentamente que sin el agregado de peróxido. (Si usted hace su blanco de hongo agregando una cantidad medida de agua, recuerde substraer el volumen del peróxido del volumen de agua que usted agrega, para lograr el correcto contenido de humedad). También podría obtener buenos resultados agregando menos peróxido, pero si usted agrega menos de 20 ml de solución 3% por cada 450 g de grano, muy probablemente necesitará diluir su peróxido en un volumen más grande de agua estéril antes del agregado, para asegurar que la solución cubra completamente el grano. Por otro lado, en la mayoría de los casos se puede agregar hasta 40 ml de peróxido sin afectar seriamente el crecimiento micelial.

Recipientes para blanco de hongo

Yo produzco mi blanco de hongo en frascos de salsa para pasta de 3/4 l, ya que los puedo conseguir fácilmente. Tienen tapas de una pieza. Los frascos de conserva de 1 litro son igualmente apropiados, sobre todo si tienen tapas de una sola pieza, pero una tapa de dos piezas puede ser útil si usted coloca un disco de cartón ligeramente sobredimensionado dentro de la tapa, de manera que sostenga la parte superior de la tapa dentro de la banda. Asegúrese de mantener limpios el interior de las tapas para cada uso, así como los “hilos” de las tapas sobre los frascos. Los vestigios de medio viejo alrededor de la boca del frasco o en la tapa pueden causar grandes problemas. Las manchas de herrumbre en el interior de las tapas también pueden atrapar tales vestigios de medio y proporcionar un lugar para el crecimiento microbiano.

Note que el agregado de peróxido hace innecesario el uso de tapas provistas con filtros microporosos como se requiere tradicionalmente. Sin embargo, las tapas del frasco son un área vulnerable, incluso con el peróxido agregado al medio, ya que usted tendrá que agitar los frascos para distribuir el micelio, y el agitado puede traer esporas de moho transportadas por el aire y que difunden dentro de la tapa (o pedazos de moho que han crecido en las hendiduras de una tapa limpiada pobremente) y entran en contacto con el micelio (el cual per se no está protegido).

Para contrarrestar la vulnerabilidad de las tapas, hago lo siguiente:

- 1) Preparo un juego de discos de cartón delgado cortado de modo de encajar dentro de mis tapas (el cartón de la caja de cereal sirve bien; simplemente trace un círculo alrededor de la tapa sobre el cartón con una lapicera, entonces corte con una tijera ligeramente por dentro del círculo trazado).
- 2) Para el "blanco de hongo de 10 minutos" mezclo los ingredientes con una tapa separada, pero coloco las tapas con los discos de cartón en su lugar justo antes de cocer al vapor.
- 3) A medida que el blanco de hongo se enfría, abro las tapas y mojo los discos de cartón con peróxido al 3% echando un par de mililitros en cada tapa. Así, los discos humedecidos con peróxido forman una barrera para la entrada de contaminantes del aire.

Para el blanco de hongo en grano o cualquier blanco que requiera esterilización a presión, envuelvo individualmente las tapas que contienen los discos de cartón con papel de aluminio, y las esterilizo en forma separada de los frascos de blanco de hongo, los cuales esterilizo usando tapas provisorias. Entonces, después de agregar peróxido al substrato esterilizado y de agitarlo, quito la tapa temporal y pongo en su lugar una de las tapas estériles con un disco de cartón humedecido con solución 3% de peróxido.

Inoculando blanco de hongo



(Inoculando "Blanco de hongo de diez minutos" al aire libre con un pedazo de micelio de una placa de agar.)

Los recipientes estériles de medio del blanco de hongo pueden inocularse de un par de maneras. Usted puede recortar trozos de micelio de cultivos de agar con un bisturí estéril y echar los trozos en el recipiente. (Si usted hace esto, primero incline el frasco o bolsa para hacer que el substrato se deslice hacia un lado, de manera que usted puede conseguir bajar a los trozos de agar en el substrato, pero todavía sobre el recipiente donde usted puede ir verificando el crecimiento). O usted puede agitar el recipiente después de agregar los trozos. Yo prefiero no agitar el recipiente, porque a menudo los trozos terminan pegándose por arriba del medio, desprotegido por peróxido, y son difíciles de desalojar por agitación posterior. Además, con el agregado de peróxido no está claro el beneficio de agitar los trozos con el medio. Los pequeños

fragmentos de micelio que son rotos de esta manera parecen ser demasiado pequeños para recuperarse eficazmente y crecer en presencia de peróxido a la alta concentración usada en el medio del blanco de hongo. Por consiguiente, dejo caer los trozos de agar (tres pedazos son adecuados para cepas de lento crecimiento) abajo en el medio y cierro el recipiente. Para el blanco de hongo en aserrín de *H. erinaceus*, también golpeo el frasco en mi mesada para empaquetar el substrato alrededor de los trozos de agar, ya que este organismo parece preferir un substrato denso, estrechamente empaquetado.

Note que el sustrato para blanco de hongo tratado con peróxido sólo debe inocularse con micelio adaptado al peróxido, es decir, micelio que ha crecido sobre agar que contiene peróxido. De otra forma, el micelio no adaptado puede morir o tomar un tiempo muy largo para comenzar un nuevo crecimiento cuando se enfrenta con la concentración relativamente alta de peróxido que yo he sugerido para la fabricación del blanco de hongo. (El substrato en masa tratado con peróxido, sin embargo, contiene una concentración mucho más baja de peróxido, por lo que puede inocularse exitosamente con blanco de hongo que no se ha adaptado al peróxido).

Mi procedimiento original era poner mis frascos inoculados dentro de bolsas nuevas de plástico para guardar alimentos, fuertemente cerradas (Yo hacía esto inmediatamente después de limpiar los frascos con alcohol para desinfectar). Usé las bolsas de plástico para proporcionar un ambiente sin movimiento de aire, y para mantener alejadas a las mosquitas intrusas del hongo. (Las bolsas pueden reusarse, con tal que estén todavía limpias). Últimamente, sin embargo, he estado incubando los frascos del blanco de hongo sin encerrarlos en bolsas, y parece funcionar igualmente bien.

Finalmente, me aseguro que los frascos estén completamente sellados y permito que el micelio crezca desde el agar durante varios días. La descomposición del peróxido agregado proporciona el oxígeno para apoyar el crecimiento micelial hasta esta fase, mientras que los niveles de dióxido de carbono aún no son muy altos. Cuando tengo un halo de crecimiento de aproximadamente un centímetro de ancho, entonces agito el blanco de hongo, y ello resulta en nuevos crecimientos que aparece en muchos lugares en el medio dentro de unos pocos días. (No espere demasiado tiempo para agitar su blanco, puesto que la cantidad de peróxido que queda para proteger el micelio disminuye constantemente a medida que se hace mas ancho el halo de crecimiento micelial desde los trozos de agar). Yo acostumbraba aflojar ligeramente la tapa del frasco después de agitar, para permitir el intercambio de gas, pero ahora lo encuentro innecesario. El disco de cartón evidentemente permite suficiente intercambio de gas aún con la tapa apretada.

El blanco de hongo está listo para usar cuando el micelio ha crecido a través del substrato no en forma densa pero sí completamente. Usualmente espero hasta que el micelio empiece a extenderse alrededor de medio centímetro o más sobre la superficie de la parte superior del medio antes de usar un frasco de blanco de hongo para la inoculación.

Si usted está usando bolsas para hacer blanco de hongo, en lugar de frascos, el procedimiento es esencialmente el mismo. Usted no tendrá que preocuparse por la entrada de contaminantes en las bolsas a medida que se enfrían--cualquiera que entre será muerto por el peróxido agregado.

¿ Y qué sobre usar el peróxido para hacer cultivos líquidos? No he seguido esta posibilidad, por dos razones. La primera es que cualquier método para inocular un

cultivo líquido probablemente requiera licuar el inóculo (o alguna otra manera que disrumpa el micelio) lo cual libera cantidades significativas de enzimas que descomponen peróxido en el medio luego de la inoculación. La segunda razón es que, asumiendo que el primer problema incluso pueda superarse, aún esperaría que la concentración del peróxido disminuya rápidamente en un cultivo líquido a medida que el material fúngico intacto con su contenido interno de enzimas que descomponen peróxido circule a través del líquido. (Con sustratos sólidos, el micelio está confinado a un área, y la concentración del peróxido en el sustrato remanente permanece en un nivel adecuado). La disminución del peróxido podría compensarse agregando regularmente peróxido nuevo, pero esto podría requerir un método para medir la concentración del peróxido en soluciones muy diluidas.

Colonización de Substrato en Masa

La colonización en masa de sustratos para fructificación es la tercera fase del cultivo de hongos, llevando directamente a la producción de hongos comestibles.

Debido a que la solución de peróxido de hidrógeno es tan barata, es económicamente factible agregar suficiente solución de peróxido a los sustratos a fructificar para ayudar a preservarlos libres de contaminantes. Y desde un punto de vista técnico, haciéndolo así es posible crecer varios hongos que descomponen madera sin tener que autoclavar o decocer el sustrato a presión. Sin embargo, para los procedimientos en este volumen, el sustrato escogido tiene que ser tal que esté desprovisto de enzimas que descomponen el peróxido. El peróxido proporcionará poco o ningún beneficio con materiales que todavía tienen mucha actividad biológica, como el abono, o la paja pasteurizada, o virutas de madera fresca que se han tratado con agua en ebullición.

El primer material ideal que encontré para el uso con peróxido fue el pellet combustible de madera para estufas a pellets. Este sustrato viene previamente tratado con calor, de manera que no causará que el peróxido se descomponga, incluso aún sin autoclavar. Como resultado, el pellet combustible puede pasteurizarse convenientemente para el uso como sustrato para fructificación por el agregado de agua hirviente, que es parte del proceso de llevar el sustrato al contenido de humedad apropiado. (Cuando usted agrega agua hirviente a pellets combustibles, vuelven a la forma de aserrín del que ellas se hicieron originalmente). Los pellets combustibles de madera dura generalmente son la mejor apuesta para la mayoría de los hongos que descomponen madera, pero los pellets hechos principalmente del abeto Douglas pueden funcionar también para sus cepas. (Sospecho que el calor y presión que se usan para crear el pellet combustible pueden degradar algunas de las resinas en el abeto que son inhibitorias para el crecimiento del hongo). Busque una marca de pellets que no tenga ningún aditivo --es decir, ligantes plásticos. La mayoría no contienen.

Otro sustrato que yo he usado con peróxido es fibra de papel reciclado "pelletizado". En mi área, esto se vende como Crown Bedding™, y como Good Mews™ Cat Litter. Estos productos han sido saneados por un tratamiento de calor doble (de acuerdo a la información promocional del material). Los pellets todavía contienen aproximadamente un 30% humedad antes de agregar agua. Al igual que con el pellet combustible, este material no tiene ningún residuo de actividad degradadora de peróxido. El inconveniente aquí es el costo, ya que sobre la base de peso seco, el precio de la cama de animal usualmente es tres veces más alto que el del pellet combustible.

Si en su parte del mundo no hay disponibles algún pellet combustible o pellets de fibra de papel, entonces para la preparación de su substrato usted debería planear usar uno de los procedimientos presentado en Volumen II. Esos procedimientos permiten una variedad mayor de posibles materiales como substratos, incluyendo algunos que contienen enzimas que descomponen peróxido. De hecho, uno de los materiales que NO trabajará con cualquiera de mis procedimientos de peróxido sin autoclavado es el aserrín crudo, es decir, el aserrín producido por la molienda de leños crudos.

Si usted tiene otro substrato que le gustaría usar con peróxido, digamos residuos de papel o cartón, pero usted planea pasteurizarlo en lugar de autoclararlo, usted deberá estar seguro de que está libre de enzimas que descomponen peróxido después de la pasteurización. Usted puede probarlo simplemente poniendo una cantidad pequeña del substrato en una taza y agregando un poco de solución nueva de peróxido al 3%. Si nada pasa enseguida, permítale que se asiente durante algún tiempo. Cuando en el substrato están presentes las enzimas que descomponen el peróxido, la mezcla burbujeará y espumará. Si todas las enzimas se han ido, la mezcla no mostrará ninguna diferencia con el substrato mezclado con agua.

Las recetas para fructificar substratos varían de una especie de hongo a otra. Para hongos que descomponen la madera, la mayoría de las recetas incluyen aserrín (que nosotros derivaremos ahora del pellet combustible), por lo menos un 1% de cal en polvo, agua suficiente para dar un contenido de humedad final de aproximadamente 60 a 65%, y de 5 al 20% del peso seco, de algún tipo de suplemento rico en nitrógeno como salvado de arroz (el cual proporciona aproximadamente 0.1% a 0.4% de nitrógeno total).

Los niveles de nitrógeno superiores en aserrín suplementado generalmente se traducen en una mayor producción de hongos, pero generalmente, el nitrógeno elevado también significa un riesgo mayor de contaminación. Con el método del peróxido, el peligro de la contaminación puede no aumentar apreciablemente con niveles de nitrógeno más altos. Sin embargo, para estar en el lado seguro, raramente subo el nivel de nitrógeno por encima del 0.4%.

Virutas de madera y densidad del substrato

Las recetas tradicionales requieren a menudo virutas de madera, pero yo nunca las incluyo en mi substrato ya que tendría la molestia de cocinar a presión a las virutas por un lado para agregarlas después al substrato en masa pasteurizado. Algunos cultivadores creen que las virutas de madera son cruciales para el buen crecimiento de shiitake. Yo no las he encontrado necesarias para el *H. ulmarius*, *P. eryngii* o *H. Erinaceus*. Sin embargo, para *H. Erinaceus*, he encontrado beneficioso comprimir el aserrín suavemente pero firmemente después de la inoculación, apretando con mis manos sobre el exterior de la bolsa y quitando el aire del substrato (pero no el agua absorbida). Esto puede servir de alguna manera al mismo propósito que agregar viruta de madera, al crear un substrato de mayor densidad. Por supuesto puedo imaginar que un organismo como *H. erinaceus* que crece alegremente en maderas tan densas como el nogal y el cerezo, prefiera un substrato denso y así crece mejor sobre aserrín comprimido que sobre uno esponjoso. En los métodos tradicionales sin peróxido en el aserrín, no sería aconsejable comprimir el substrato, debido al peligro de crear condiciones anaeróbicas favorable a los organismos deletéreos. Con peróxido en el substrato, sin embargo, la descomposición del peróxido proporciona un nivel beneficioso de oxígeno incluso en el substrato comprimido, haciendo posible así

proporcionar la densidad que algunos de los organismos prefieren sin inducir anaerobiosis.

Preparando aserrín suplementado con peróxido

Aquí está lo que hay que hacer con el pellet combustible:

- 1) Primero, consiga un recipiente como un balde plástico de 19-20 litros con una tapa que ajuste bien, y lo limpia cuidadosamente. (Para mi limpieza rutinaria, limpio el interior del balde con una esponja de raspar y detergente para vajilla biodegradable, y luego enjuago bien).
- 2) A continuación enjuago el recipiente y su tapa con agua hirviente --una tetera llena alcanzará. De aquí en adelante, usted necesitará evitar tocar el interior del balde o el borde.
- 3) Coloque el balde flojamente cerrado en una balanza y agregue aproximadamente 3,5 kg de peso seco de pellets si usted tiene de roble, o 3 kg si usted tiene una madera más blanda como la del abeto (si usted prefiere medir por volumen, 3 kg equivalen groseramente a 4 litros de pellets. Para hacer mis agregados uso una jarra de vidrio de 1 litro en la que he hervido un poco de agua sobre el mechero, pero realmente no necesita estar pasteurizada). Usted probablemente tendrá que hacer sus propios ajustes para su pellet combustible local, estableciendo el peso que usará según la cantidad de aserrín que usted puede hacer entrar en su balde junto con los suplementos y el blanco, al tiempo de dejar todavía suficiente espacio para mezclar los contenidos del balde eficientemente.
- 4) Si usted está usando un suplemento de nitrógeno desnaturalizado sólido, como el CG60 de Sylvan o el Millichamp 3000, puede agregarlo al pellet combustible en esta fase.
- 5) Agregue la cal al pellet combustible. Yo uso cal proveniente de caparazón de ostras, pero antes de usarla, la horneo a 400 °F (200 °C) por un par de horas. Esto elimina cualquier enzima que descompone peróxido presente debido al crecimiento microbiano en los caparazones. La piedra caliza molida también es una buena elección si Ud. la puede conseguir. No use cal de dolomita porque contiene magnesio que puede inhibir el desarrollo de los hongos. Para los hongos cultivados sobre pellet combustible de roble, yo uso 2 oz (56,7 gramos) de cal, o la mitad en el caso de pellet combustible más liviano, como el de álamo americano.
- 6) Hierva en una olla cubierta la mitad de la cantidad de agua que usted quiere agregar a los pellets. (Su agua debe estar limpia y libre de cualquier particulado obvio. En algunos casos puede necesitar una filtración). Para este paso, yo hiervo aproximadamente 3,5 litros para unos 4 kg de pellets combustibles de roble. (Si usted está usando un suplemento de nitrógeno soluble como un fertilizante artificial, puede agregarse al agua antes de hervir). El pellet combustible de aserrín de abeto es menos denso, así que sólo uso un poco más 3 kg, hirviendo unos 3 litros de agua. Usted puede querer experimentar con diferentes contenidos de humedad para las especies que usted está cultivando. Una ventaja de agregar peróxido a sus cultivos es que usted puede agregar más agua de la que podría de otra forma, sin desarrollar áreas anaeróbicas en su substrato que podrían desarrollar contaminación. Sin embargo, el aserrín de los pellets combustibles tiende a aglutinarse a medida que se agrega más agua, lo cual lo hace más difícil de volcar después al interior de las bolsas sin derramar.
- 7) Cuando el agua ha hervido durante un minuto, ponga la tapa del balde cuidadosamente a un lado y vierta el agua hirviente encima del substrato. Ajuste la tapa y mezcle el substrato dando vuelta el balde por un par de minutos para distribuir el agua.

- 8) Hierva en otra olla cubierta la otra mitad del agua , (esto es, otros 3.5 litros de agua) que usted va a agregar a los pellets. Cuando el agua ha hervido durante un minuto, apague el mechero y coloque a un lado esta olla de agua para enfriarse con la tapa en su lugar. Más tarde usted usará este agua para agregar peróxido.
- 9) Permita que el balde con sustrato se enfríe, con la tapa en lugar. El enfriamiento usualmente toma varias horas. El fondo del balde sin embargo puede estar algo tibio al tacto en el momento del agregado de peróxido.
- 10) Con una taza de medir enjuagada con agua en ebullición, agregue aproximadamente 1/2 taza de solución 3% de peróxido a la olla de agua hervida y enfriada que usted ha puesto a un lado.
- 11) Vierta la mezcla del peróxido en el balde con el sustrato enfriado y mezcle completamente dando vuelta el balde. Esto da una concentración final del peróxido de aproximadamente 0.03%, o una dilución de uno en cien.
- 12) Deje que el sustrato termine de enfriarse a temperatura ambiente. Y ya está listo para usar.

Quizás a estas alturas usted se está preguntando si este procedimiento se puede simplificar de la misma manera que el procedimiento del “blanco de 10 minutos”. Si la concentración del peróxido se aumentara para compensar por la descomposición en el sustrato caliente, quizá el peróxido se podría agregar al principio del procedimiento con toda el agua. Esto de hecho puede ser posible con una concentración suficientemente alta de peróxido inicial. Sin embargo, el sustrato toma el doble de tiempo para enfriarse cuando toda el agua se agrega inicialmente como agua hirviente. Bajo estas condiciones, sospecho que al peróxido le será difícil sobrevivir a la exposición al calor, aun cuando la concentración inicial se elevara varias veces.

Suplementos nitrogenados para sustrato en masa

Si usted está usando suplementos de nitrógeno tradicionales como salvado mijo o de arroz, tendrá que cocinarlos a presión. Mientras todavía está caliente, el suplemento esterilizado se agrega al sustrato pasteurizado que se está enfriando. Antes de verter, tenga cuidado de limpiar los goteos o derrames en el exterior de los frascos.

La mayoría de los suplementos de nitrógeno tradicionales para el cultivo de hongos requiere la cocción a presión para eliminar las enzimas que descomponen peróxido, antes pasteurización. (Estas enzimas son notablemente estables, y los procedimientos normales de pasteurización generalmente no son suficiente para inactivarlas, incluso con suplementos finos como el salvado). Sin embargo, como ya discutí en la sección sobre hacer blanco de hongo en aserrín, ahora he encontrado unos pocos suplementos que están libres enzimas y así pueden agregarse sin esterilización a presión, en este caso mezclado con los pellets de madera. Dos de éstos son suplementos de nitrógeno comercialmente fabricados ya en uso en la industria del hongo *Agaricus* (Millichamp 3000 y CG 60 de Sylvan). Contienen proteína de soja y gluten de maíz desnaturalizados, respectivamente, y es evidente que el proceso de desnaturalizado destruye las enzimas que descomponen peróxido. Estos suplementos son excelentes, pero los aficionados domésticos pueden tener dificultad para obtenerlos. También, se debe tener cuidado para evitar que se estropeen en almacenamiento, sobre todo el Millichamp 3000.

Algunas formas algo más caras de proteína procesada están disponibles más fácilmente, tales como Proteína Vegetal Texturizada, leche de soja en polvo, o leche de vaca en polvo.

Otro tipo de suplemento que puede usarse sin la esterilización a presión es simplemente el fertilizante químico, como el estándar 20-20-20. Como éstos fertilizantes no provienen de organismos vivos, no contienen enzimas que descomponen peróxido. No obstante, en gran parte los nutrientes que contienen pueden ser utilizados por el micelio de hongos después de un periodo de adaptación. Si usted va a probar este método de suplementación, le recomiendo que prepare blanco de hongo en aserrín usando el mismo suplemento, de manera que el período de adaptación ya habrá tenido lugar para cuando usted inocule su substrato en masa. También, usted tendrá la oportunidad de ver cómo el fertilizante particular que ha elegido funcionará con el organismo que está cultivando. Las formulaciones de fertilizantes varían bastante, incluso con la misma proporción de NPK (nitrógeno, fósforo, potasio), de manera que es probablemente aconsejable probar su fertilizante seleccionado con un pequeño cultivo antes de seguir sobre substrato en mayor cantidad.

La urea es una fuente común de nitrógeno en las formulaciones de los fertilizantes químicos, y probablemente también se puede usar por sí misma como un suplemento sin esterilización a presión.

Si usted quiere algo más "orgánico" que el fertilizante artificial (y hay buena razón para evitar depender de sustancias que requieren energía del petróleo para su fabricación), la orina humana y la orina de animal también pueden servir como suplementos que no necesitan cocción a presión. Sin embargo, ellas deben mantenerse relativamente libres de microorganismos hasta el uso. El agregado de peróxido proporciona una manera de hacer esto.

Calculando cuánto suplemento agregar

¿Cómo calcula usted cuánto usar de los diferentes suplementos? Los cálculos son sólo aproximados, y usted finalmente necesitará tomar decisiones basadas en el rendimiento real de los hongos a distintos niveles de suplementación. Pero usted puede obtener una idea de lo que usted necesitará consultando el libro *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms* de Stamets, donde la información revela que el salvado de arroz tiene una proporción de NPK de aproximadamente 2 : 1,3 : 1. De manera que, si ordinariamente el substrato se complementa con 5 a 20% de salvado de arroz, lo cual sugiere Stamets, entonces un fertilizante 20-20-20, que tiene 10 veces más nitrógeno que el salvado de arroz, se debería agregar en un décimo de la dosis del salvado de arroz, o 0.5 a 2% del peso seco de substrato. Si estuviera agregando cerca de 1 kg de salvado de arroz a un balde de pellets combustibles, usted en cambio agregaría 50 g de fertilizante 20-20-20, es decir, un décimo de aquella cantidad (1/2 kg) de salvado. Con los suplementos comerciales, usted necesitará averiguar del fabricante qué porcentaje de nitrógeno contiene el material, y dividir ese número por 2.0 para conocer qué fracción de aquella cantidad de salvado de arroz debería agregar. El Millichamp 3000 de Sylvan, hecho de soja, tiene aproximadamente 7.3% de nitrógeno, de manera que se usará en aproximadamente una cuarta parte de la dosis de salvado de arroz.

Usted también puede calcular directamente la cantidad del material necesario para obtener desde un 0.1% a 0.4% nitrógeno en el substrato final, sin tener en cuenta la cantidad de salvado de arroz usado por Stamets:

- 1) divida el porcentaje de nitrógeno del suplemento por el porcentaje final de nitrógeno deseado en el substrato.

- 2) divida el número anterior por el peso total de sustrato a ser suplementado para obtener el peso del suplemento a agregar.

Así, para conseguir 0.2% en nitrógeno final (lo cual requiere una proporción de suplementación de aproximadamente 10% del peso seco de sustrato con salvado de arroz), ¿cuánta harina de soja necesitaríamos agregar? Si la harina de soja contiene 7.6% de nitrógeno, 7.6 dividido por 0.2, da 38. Si el peso total de sustrato es 3 kg, entonces 3 kg divididos por 38 da 0,08 kg, u 80 g de harina de soja a ser agregada.

Nota sobre la medición de pH de sustrato

Yo uso tiras de ColorpHast con un rango de pH 4 a 10 para medir el pH de todos mis medios y sustratos, en la mayoría de los casos apuntando a un pH en el rango 6-7. Las tiras de ColorpHast son baratas y convenientes y, con una comparación en tres colores, usualmente estoy seguro de mi lectura. Sin embargo, no es una buena idea intentar medir el pH del medio con una tira de color indicadora después que se ha agregado el peróxido, ya que el peróxido puede cambiar la química del indicador. Con los cultivos en agar y el sustrato para blanco, usted puede medir el pH fácilmente antes de la esterilización. Con los pellets combustibles, use un pequeño recipiente del tamaño de una taza de medida (que haya sido enjuagada con agua hirviendo) para sacar una cantidad pequeña de sustrato del balde después de agregar y mezclar con el agua hirviendo y la cal. Usted entonces puede usar sus tiras de color indicadoras para medir el pH del sustrato retirado. Sea consciente, sin embargo, que si usted ha agregado cal granular la cual se disuelve muy lentamente, la lectura le dará sólo una idea relativa del pH al que se expone el micelio de hongo. El agregado de cal (CaOH, disponible en bolsas grandes como "cal de constructores" en los comercios de suministro de materiales de construcción) permite evitar el último problema, ya que se disuelve y reacciona mucho más rápidamente, pero con algunos hongos puede haber una ventaja al proporcionar un fuente de alcalinidad de "liberación lenta" tal como la que proporciona la cal granular. Entonces, usted simplemente tendrá que calibrar la cantidad de cal usada en función del rendimiento final de hongos, para determinar la dosis óptima.

Recipientes de cultivo

Tradicionalmente, los cultivos en aserrín han sido cultivados en bolsas de plástico especiales con parches de filtro microporoso, para permitir el intercambio gaseoso sin permitir que entren los contaminantes. Con el peróxido en su sustrato de fructificación usted, sin embargo, podrá usar bolsas de basura ordinarias (con un ahorro de 50 - 80 centavos por bolsa) para cultivar sus hongos. Evidentemente el proceso usado para producir bolsas de basura las pasteuriza al punto que ellas no albergan una significativa contaminación con organismos vivientes. Con la presencia del peróxido, incluso no necesitan cerrarse. Si usa bolsas de basura de plástico, yo le recomiendo usar el tipo que se hace con plástico de alta densidad, 0.5 mil de espesor o menos. Las bolsas más gruesas y suaves aparentemente están hechas de PVC, que puede dejar residuos estrogénicos en los cultivos de hongos. Además, algunas de estas bolsas más suaves están impregnadas con fungicidas.

A menos que usted use las tradicionales bolsas armadas especiales para hongos, usted necesitará poner las bolsas dentro de recipientes de un tamaño apropiado para proporcionar una forma para el sustrato. Cajas pequeñas que pueden contener 2,5-3 kg de sustrato a menudo pueden ser recogidas de las desechadas en comercios de alimentos dietéticos o similares, o usted puede comprar recipientes de plástico baratos.



Como las bolsas no están cerradas, las mosquitas de los hongos pueden ser un problema, pero pueden evitarse colocando sobre el conjunto de cajas una cubierta liviana de tela del tipo Reemay™ o con sábanas viejas. Con algunas especies como *H. erinaceus*, usted puede sellar las bolsas de sustrato retorciendo hasta cerrar firmemente, y el cultivo igualmente lo colonizará por completo, usando el oxígeno suministrado por la descomposición del peróxido y/o difusión a través de la bolsa. En contraste, para lograr la completa colonización, *P. eryngii* parece necesitar algo de aire adicional en el período posterior del ciclo de crecimiento.

Las bolsas plásticas desechables son un problema cuando los residuos se usan para el relleno de tierras. Una alternativa es reemplazarlas por recipientes de plástico con tapas, de 8 o 12 litros en tamaño, preferentemente de plástico HDPE, de reciclado número 2. (Los recipientes de 20 litros son más fáciles de encontrar, pero son demasiado grandes para su cantidad promedio de medio de cultivo en aserrín). Éstos pueden limpiarse con detergente y reusarse después de enjuagarlos con agua hirviente. Si las tapas se dejan ligeramente sueltas durante la corrida del blanco de hongo para permitir el intercambio de gas, estos baldes son excelentes recipientes de cultivo para especies de hongos que fructifican verticalmente, como *P. Eryngii*. Los *H. erinaceus* también crecerán en ellos si usted abre el balde y lo coloca de costado cuando llega el tiempo de fructificación. (Sólo llene el balde con sustrato a un tercio o a un medio de su capacidad, de manera que la parte superior del balde proporciona un barrera de humedad). Los *H. ulmarius* estarían un poco apretados en el espacio de estos baldes, a menos que usted los llene con sustrato casi hasta el tope, para que los racimos del hongo puedan crecer por encima del borde. Después, para conseguir una segunda oleada, usted necesitará sacar el bloque del balde y colocarlo al revés, ya que al *H. ulmarius* no le gusta fructificar dos veces en la misma superficie.

Inoculando aserrín suplementado

Preparo el blanco de hongo para la inoculación de la manera tradicional:

- 1) El día antes de usar el blanco de hongo, lo desagrego golpeando el frasco contra algo duro protegido por algo suave.
- 2) cuando las partículas están separadas, vuelvo a poner el frasco en mi estante de blanco de hongo e incubo toda la noche para dar al micelio una oportunidad de retomar algo de nuevo crecimiento. Esto significa una diferencia considerable en cuanto a la rapidez con que el micelio surgirá en el nuevo sustrato. Si estoy trabajando con blanco de hongo en grano, también me da una oportunidad para ver la contaminación bacteriana en la forma de granos "húmedos" o "grasientos" que no han adquirido una nueva "pelusa" de micelio. Cuando su blanco de hongo ha sido producido usando peróxido, la presencia de dos o tres granos húmedos probablemente no interferirá con el futuro éxito de la colonización del sustrato en masa, ya que las bacterias que son capaces de sobrevivir a la exposición al peróxido son generalmente organismos bastante benignos cuando están presentes en cantidades pequeñas. Sin embargo, si usted tiene bastante más granos húmedos que dos o tres, las bacterias retardarán substancialmente la colonización del sustrato en masa, lo que dará una oportunidad al moho para que pueda ganar la entrada. De manera que usted seguramente querrá desechar cualquier blanco con una cantidad significativa de granos húmedos.
- 3) Inoculo el aserrín de pellets combustibles desagregando el blanco de hongo brevemente, colocándolo luego directamente en el balde de 20 litros con el sustrato. Cierro la tapa y mezclo todo junto rotando el balde.



- 4) Finalmente, pongo la mezcla en las bolsas. Cada bolsa se abre y se pone dentro de una caja del tamaño apropiado para recibir el sustrato.
- 5) Una vez llena cada bolsa a la capacidad de la caja, cierro la tapa sobre el sustrato remanente inoculado, y teniendo cuidado de no tocar la superficie interior de la bolsa, la muevo un poco para llenar cualquier hueco, entonces retuerzo la boca de la bolsa y la cierro con un alambre plástificado.



- 6) Por último, comprimo el aserrín apretando sobre la bolsa, suave pero firmemente. Esto acelera el crecimiento de algunos cultivos, sobre todo con un aserrín liviano como el de abeto o de alamo.

Después de etiquetarla, la caja está lista para incubar, y de aquí en más, sigo los procedimientos normales para el cultivo de hongos. Usted puede usar los bloques de micelio resultantes ya sea directamente para la fructificación de hongos, o los bloques pueden servir como blanco para inocular troncos o camas de virutas de madera fresca al aire libre.

Formación del hongo

Para la mayoría de las especies que usualmente se cultivan, y siempre que el substrato se haya colonizado completamente, la formación del hongo comienza en seguida después que los cultivos se ponen a temperaturas más frías, se les da más luz y más aire nuevo. No hay mucha necesidad de peróxido de hidrógeno durante esta fase, ya que el micelio está bien establecido.

Los procedimientos precisos para inducir la formación del hongo difieren de una especie a otra, y están más allá del alcance de este manual, pero yo daré lineamientos para mis especies favoritas. Dos de las especies de hongos más familiares para mí también están entre las más fáciles de fructificar: *Hypsizygus ulmarius* (el hongo del olmo blanco) y *Hericiium erinaceus* (el hongo melena de león o Pom Pom). Muchas especies del hongo ostra siguen procedimientos similares al requerido por *H. Ulmarius*. Las otras especies más conocidas para mí, *Pleurotus eryngii* (rey ostra) y *Agaricus subrufescens* (hongo de la almendra) siguen un modelo de fructificación diferente. El Shiitake sigue aún otro.

La mayoría de las especies "fáciles" de hongos están listas para fructificar cuando el sustrato en masa está completamente colonizado. A menudo, en este momento los bloques aparecen blancos, en lugar del color castaño original del sustrato. Cuánto tiempo requiere un cultivo para alcanzar la madurez depende del organismo, del sustrato y de la temperatura de incubación. *Hericiium* puede necesitar tan poco como 2-3 semanas para formar los primordios iniciales de fructificación (blancos, globulares y pequeños) en la superficie superior del bloque, pero me gusta esperar hasta que ha pasado un mes antes de abrir las bolsas. El *H. ulmarius* requiere aproximadamente 5 semanas sobre aserrín de abeto o paja y seis semanas en aserrín de roble (a temperatura ambiente ordinaria), y después los pequeños racimos de primordios "cabeza de alfiler" empezarán a formarse espontáneamente. Haciendo una "X" o un simple corte con un cuchillo limpio sobre un costado a través de la bolsa, *H. ulmarius* y varias especies del hongo *Ostra* usualmente formarán los primordios en el sitio del corte dentro de una a dos semanas, y los hongos se desarrollarán rápidamente. Luego de hacer los cortes, se debe suministrar humedad en forma de niebla o rocío para ayudar a la formación de los primordios y la subsecuente formación de los hongos. Si resulta inconveniente suministrar esta niebla o rocío, puede cubrir unos pocos bloques con una lámina de plástico transparente o una tela de cobertura rústica tipo Reemay™, para ayudar a retener humedad a medida que los hongos se desarrollan. Con muchos bloques, sin embargo, aumentará la necesidad de ventilación para eliminar el dióxido de carbono. Cuando usted tenga suficientes bloques como para necesitar un ventilador, tampoco estará muy lejos un sistema automático para suministrar niebla.

Hericiium también formará hongos en el sitio del corte en la bolsa, pero yo encuentro más fácil cultivar grandes cuerpos en fructificación permitiendo que el organismo fructifique dentro de la bolsa. Simplemente de vuelta el bloque sobre su costado y abra la bolsa un poquitito, permitiendo el intercambio de aire pero aún proporcionando una barrera para la humedad. Luego rocíe con niebla ligera la superficie expuesta del bloque, una vez por día. Los cuerpos fructíferos se formarán al azar desde los iniciales de fructificación que ya han desarrollado. Con *Hericiium*, a mi me gusta agregar una pequeña cantidad de peróxido de hidrógeno al agua de niebla, para eliminar los problemas de crecimiento bacteriano.

Note que si usted decide crecer *H. ulmarius* u otras especies del ostra en su casa, probablemente necesitará tomar precauciones para protegerse de la tremenda cantidad de esporas producidas por estos organismos. Cosechar los hongos cuando son jóvenes puede ayudar a mantener baja la carga de esporas. Cubrir los cultivos en fructificación con Reemay™ u otro material rústico de cobertura mantendrá la mayor parte de las esporas dentro de la cobertura, a la vez que permite suficiente intercambio de gas para la fructificación. Sin embargo, si usted o alguien en su familia es sensible a las esporas, usted puede necesitar comprar un purificador de aire para eliminar las esporas del aire en su vivienda, o bien mantener los cultivos en un cuarto exterior separado de la casa.

El hongo almendra y el hongo botón, así como el Rey *Stropharia* y el Melena Lanuda, y a veces el Rey *Ostra*, todos necesitan algo llamado capa de cobertura que se aplica al cultivo en fructificación para estimular la formación del cuerpo del hongo. La cobertura es una mezcla diseñada para imitar un suelo arcilloso húmedo, y friable. Contiene microorganismos que promueven la formación del hongo, y proveen un depósito de humedad para el crecimiento del hongo. Generalmente contiene una baja nutrición disponible para el crecimiento del micelio del hongo, y esta característica también envía una señal al cultivo para empezar la formación del hongo.



(Los hongos almendras con la capa de cobertura)

En general la cobertura contiene turba de musgo, y una fórmula simple que yo he usado para los hongos almendra simplemente se hace con una parte de turba mezclada con una parte de tierra de jardín, más un puñado de yeso (sulfato de calcio) para 8 o 12 litros de mezcla, todo humedecido hasta saturación pero sin aglutinamiento. La cobertura se aplica en la parte superior del cultivo del hongo hasta un espesor de 5 centímetros como máximo. Tenga cuidado de no apisonarla, ya que la estructura porosa es esencial para estimular la formación de los primordios del hongo.

Los pantanos de turba son hábitats en peligro en todo el mundo, por lo que necesitamos encontrar alternativas para usar como cobertura. Desgraciadamente, no tengo todavía una respuesta completa para este problema. En algunos casos, el suelo sólo puede servir, o el suelo más vermiculita. La vermiculita es por sí misma una posible alternativa (aunque no suministra microorganismos). Los hongos almendra y Rey Ostra no requieren en absoluto una cubierta (sin embargo, la cobertura tiende a acelerar la formación de los primordios con *P.eryngii*), de manera que la manipulación de las condiciones para estos organismos puede llevar a una buena fructificación sin necesidad de cobertura.

Si usted aplica una cobertura, luego necesitará esperar una semana o dos para que el micelio crezca en la cubierta antes que los hongos empiecen a formarse. Con el hongo almendra, éste es el momento para entibiar los cultivos (para estar seguro de que ellos están suficientemente calientes, pongo las cajas con mis cultivos del hongo almendra sobre un “calentador eléctrico para gato”). También es el tiempo para rociar ligeramente la cubierta con agua cada dos días para mantenerla húmeda. (Con *P. eryngii*, el calentamiento y el rociado no son necesarios). Los hongos usualmente empiezan a formarse unos días después que el micelio alcanza la superficie de la cobertura.

Planificación estacional

Si está cultivando sólo unos pocos hongos, y tiene un espacio interior aislado y fresco como el de un sótano iluminado, usted probablemente podrá cultivar sus hongos favoritos todo el año. Sin embargo, si usted está cultivando al aire libre, o está cultivando muchos hongos en el interior (de manera que usted requiere ventilación del exterior), necesitará planear de antemano para tener listos los cultivos de hongo apropiados en la correcta estación. Yo fructifico mis hongos en un sótano con las ventanas abiertas y un ventilador para traer aire nuevo, de manera que el cultivo de hongos se pone más difícil en la parte más caliente del verano y en la parte más fría del invierno. El cierre de las ventanas no es una opción, ya que se elevará la concentración del dióxido de carbono e inhibirá la formación del hongo. Ciertamente es posible calentar o enfriar el aire entrante, pero para mi gusto hace subir demasiado la factura de energía. De modo que todos mis hongos se cultivan mejor en otoño y primavera.

En la parte más fría del invierno, la temperatura y los niveles de luz disminuyen. Todos los hongos tardan mucho más tiempo para terminar de colonizar el sustrato. *P. eryngii* fructifica con dificultad, y el *H. ulmarius* crece muy lentamente y produce tallos más largos (y sombreros deformados, si la luz y niveles de temperatura son demasiado bajos). El *H. erinaceus* también crece lentamente en esta época, pero aún es capaz de producir cuerpos de frutos normales, aunque pequeños, aún en tiempo muy frío. *Agaricus subrufescens* necesita calor moderado, pero paradójicamente constituye un hongo aceptable para cultivo interior en el invierno, porque fructificará en un ambiente calefaccionado y no necesita tanto aire o luz como los otros hongos.

En el período más caluroso del verano, hay mucha luz, pero puede ser un problema para iniciar la fructificación a temperaturas más altas. También conservar una alta humedad puede ser difícil. Sin embargo, yo he tenido bloques de *H. erinaceus* fructificando sobre una pila de compost seca con 32°C; evidentemente el aire renovado exterior comenzaba la fructificación en aquél caso, ya que los bloques de *H. erinaceus* en el interior se negaban a fructificar hasta que la temperatura bajaba substancialmente. Al *Agaricus subrufescens* le gusta el tiempo caluroso y tiende a fructificar a medida que pasa el pico de temperatura alta. El *Ganoderma lucidum* también prefiere tiempo caluroso, al igual que el *Stropharia*.

Crecimiento al aire libre vs. crecimiento en el interior

Yo acostumbraba cultivar casi todos mis hongos en el interior. Esto me permitía cultivarlos el año entero debido a la temperatura más moderada, y también me ahorraba de tener que tratar con las babosas y caracoles que aman a los hongos y crecen en grandes cantidades en mi área. (Realmente, todavía encuentro unas babosas que se las arreglan para subir en mis ventanas, viajar abajo en la pared de cemento del sótano y por el suelo de cemento, y eventualmente entran en mis cultivos en fructificación). Los ciervos también pueden comer hongos, y las mosquitas del hongo pueden ser un problema en cultivos de hongo al aire libre. De manera que en el pasado, siempre he recomendado el cultivo en el interior. Pero el crecimiento al aire libre también tiene sus ventajas. En primer lugar, los hongos fructificados en el exterior tienen un sabor distintivamente superior al de hongos crecidos en el interior. También, la formación del hongo puede ser más robusta en el aire renovado del exterior. Hay más espacio físico para los cultivos. Y no hay problema con respirar esporas de hongos. Las mosquitas de los hongos pueden reducirse algo cubriendo los cultivos con un tejido ligero como el de Reemay(MR) u otros materiales de cobertura de surcos. Y si usted vive en una región templada sobre la costa del mar, usted puede

ser capaz de cultivar hongos al aire libre todo el año entero. De manera que si usted piensa que puede mantener todas las pestes alejadas, siga adelante y fructifique sus cultivos afuera. Usted necesitará apenas una área sombreada que pueda mantenerse húmeda.

Cosecha

Conocer cuándo cosechar los hongos implica fundamentalmente conocer cuán grandes van a crecer y qué cambios sufren a medida que maduran. Con *P. eryngii* y *H. ulmarius*, la pérdida de la curvatura del margen del sombrero usualmente es una señal de que el hongo ha alcanzado la madurez, pero para estar seguro usted necesitará correlacionar este cambio con el tamaño del hongo. Con *A. subrufescens*, el sombrero se abre y las láminas empiezan a ponerse de color rojizo. Con *H. erinaceus*, se forman pequeños “estalactitas” y el hongo se ablanda.

Se dice que la mayoría de los hongos son más sabrosos si se cosechan antes de que empiecen a soltar muchas esporas, aunque todavía puedan ganar más masa si se les permitiera crecer más. Ciertamente es verdad que el *H. ulmarius* es más sabroso cuando es joven, pero no he hecho personalmente comparaciones de sabor con las otras especies de hongo que cultivo.

Dificultades

A pesar de mi uso del peróxido de hidrógeno para proteger mis cultivos de hongos, hubo muchas ocasiones donde las cosas no fueron como yo las había planeado y aparecía la contaminación. Cada vez, tenía que rastrear hacia atrás el problema y corregir mi procedimiento, y cada vez me sentía aliviado al comprender que el uso del peróxido per se no había sido la falla. Los procedimientos que he descrito aquí, en mi opinión incorporan todo lo que he aprendido de mis errores y deberían cubrir los puntos claves requeridos para producir hongos libres de contaminación con el método basado en el uso del peróxido. No obstante, las dificultades son una parte inevitable del cultivo de hongos, y usted tendrá que enfrentarlas más tarde o más temprano.

Yo siempre encuentro descorazonante leer las listas de las cosas que pueden salir mal. En su lugar, he creado una lista de preguntas que llaman la atención a diferentes aspectos del proceso de cultivo con el propósito de resolver problemas de contaminación.

Si usted está agregando peróxido, y sin embargo sufre una contaminación significativa, puede hacerse algunas de las siguientes preguntas:

La concentración de peróxido en su solución stock es la que debería ser? Ha transcurrido más de un mes desde que usted la ha medido?

Su equipo de cocción a presión está funcionando adecuadamente?

El vapor es capaz de entrar en sus frascos y equilibrarse (las tapas están sueltas lo suficiente?) Si realiza la cocción a presión, permite usted que pasen 5 minutos para que el vapor se equilibre antes de poner el regulador de presión?

Si su cocina es eléctrica, está el elemento de calefacción calentando constante y correctamente?

Está usted cocinando a una temperatura suficientemente alta y por el tiempo suficiente como para eliminar los contaminantes residentes y, si fuera el caso, a las enzimas que descomponen el peróxido?

Está su substrato lo suficientemente húmedo como para que penetre el vapor de agua?

Su substrato o suplemento ha sufrido alguna descomposición antes de usarlo?

Su peróxido se está distribuyendo uniformemente a través del medio?

Es precisa su medición de pH? (El peróxido es aparentemente más estable alrededor de pH neutro).

Si su substrato de fructificación está apareciendo contaminado, está limpio su blanco?

Si su blanco está apareciendo contaminado, está limpio su inóculo?

Si usted está vertiendo peróxido diluido en sus cultivos, hay goteos que corren sobre las superficies no esterilizadas antes de caer en el cultivo?

Sus cajas de petri están libres de trazas de medio viejo?

Si sus placas de agar están apareciendo contaminadas, la contaminación está sobre la superficie o en el interior del agar? Si está sobre la superficie entonces busque por una fuente contaminación externa al medio del agar, si está en el interior del agar, la contaminación está entrando antes o durante el vertido.

Antes de agregar el peróxido, usted permite que su medio o substrato se enfríe suficientemente?

Su agua es limpia y está libre de particulados?

Ha pasado por alto alguna fuente de material no esterilizado o no pasteurizado que pueda haber entrado en sus cultivos?

Sus hongos están recibiendo suficiente luz (pero no solar directa), aire nuevo, y humedad para crecer hasta un buen tamaño?

Conclusión

Llegando al final de este manuscrito, estoy forzado a hacer una pausa para un momento de autoevaluación. He llamado a este volumen Cultivando hongos de manera fácil, y ahora debo preguntarme si no fui un poco indulgente y exagerado cuando elegí ese nombre. Después de todo, en el cultivo de hongos hay aún más caminos para que las cosas salgan equivocadas que los que hay para que salgan correctas. Y a veces pienso que es realmente una maravilla que nosotros hagamos que estos organismos respondan a nuestro “ruego” y produzcan sus deliciosos cuerpos de fructificación.

Bien, es una maravilla. Y aún con el peróxido manteniendo los cultivos de hongos, el proceso está lejos de ser a prueba de tontos. Pero me siento gratificado porque el procedimiento que he descripto hace posible que los aficionados, con al menos un mínimo grado de comodidad en el manejo de las técnicas estériles, realicen todos los pasos del crecimiento de hongos gourmet y el cultivo de hongos en un ambiente doméstico, más fácilmente que nunca antes, y sin más equipos especiales para el control de contaminantes que una olla para producir vapor y una pipeta de medición. Y al eliminar la tensión de tener que batallar con los contaminantes, los cultivadores domésticos son libres finalmente de enfocarse en la cosa que en primer lugar nos atrae a todos al cultivo de hongos, la búsqueda de aún más de esos hongos bonitos y deliciosos.

Sobre el Autor

Rush Wayne posee un grado de Magister en Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Harvard y un Ph.D. en Bioquímica de la Universidad de California en Berkeley. Él se expuso por primera vez a los fundamentos del cultivo de hongos durante su trabajo de graduado en los 1970's pero recién comenzó a cultivar hongos formalmente cuando empezó a llevar a cabo las innovaciones contenidas en este manual, en 1993. Las instrucciones para su método del peróxido para el cultivo de hongos están ahora en manos de cultivadores de hongos en más de 75 países alrededor del mundo.

Sobre el Traductor

Néstor Curvetto es Investigador Principal del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y Profesor Titular en el Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur (UNS) de la República Argentina. Es Magister en Ciencias Agrarias de la Universidad de Guelph (1979, Canadá) y Doctor en Bioquímica (1986, UNS, Argentina). Su área de investigación y docencia es la fisiología y el cultivo de tejidos en plantas pero desde principios de los 90 se interesó también en la biotecnología de hongos comestibles y medicinales con énfasis en especies de *Pleurotus*, *Lentinula* y *Ganoderma* y ha organizado cursos de posgrado con la participación de expertos de Nueva Zelandia y Canadá. Tiene un gran interés en la divulgación de diferentes métodos de producción de hongos para su incorporación al sistema productivo intensivo de los países emergentes.

Cultivando Hongos de Manera Fácil

**Cultivo de Hongos
en el Hogar
con Peróxido de Hidrógeno**

Volumen II

R. Rush Wayne, Ph.D.

Cultivando Hongos de Manera Fácil
Cultivo de Hongos en el Hogar con Peróxido de Hidrógeno
Volumen II

Copyright © 2001
R. Rush Wayne. Ph.D.

Todos los derechos reservados. Ninguna parte de este trabajo puede reproducirse o puede usarse en cualquier forma o por cualquier medio sin permiso del autor.

Volumen I publicado por primera vez como Growing Mushrooms with Hidrogen Peroxide,
Diciembre 1996

Volumen II publicado por primera vez Agosto 2000

Revisado y ampliado, Julio 2001

Traducción en Español, Septiembre 2001, Néstor Curvetto

Visite la página de actualización del sitio Web Cultivando Hongos de
Manera Fácil

<http://www.mycomasters.com/Esp/Actualizaciones.html>

para las actualizaciones periódicas a este manual
y noticias sobre el método del peróxido.

CONTENIDOS

1 **Introducción**

2 **Adquiriendo, Almacenando, y Manteniendo Cultivos de Hongos**

Usando agar en pico de flauta en lugar de agar en placas

- Los inconvenientes de cultivo en caja de Petri
- Las ventajas y desventajas del agar en pico de flauta
- Haciendo picos de flauta con peróxido
- Haciendo transferencias a y desde cultivos en agar en pico de flauta
- Limpiando el micelio con cultivos en agar en pico de flauta

4 **Medio basado en cerveza (MBC)**

5 **Empezando con esporas**

- Las ventajas y desventajas del cultivo de esporas
- El peróxido y una nueva visita a las esporas
- Recolección de esporas
- Germinando esporas por el método del disco

7 **Ideas para el Cultivo de Micelio sin Agar**

- ¿Por qué encontrar a un sustituto para el agar?
- Cómo preparar las placas
- Haciendo transferencias
- Limpiando el micelio
- El almacenamiento de cultivos sin agar
- Enviando cultivos en el correo

11 **Re-esterilizando placas de Petri descartables con Peróxido**

Preparación de Blanco

12 **Blanco en bolsas de Plástico - "Blanco de hongo de ocho minutos"**

- Las ventajas y desventajas de bolsas de plástico
- Haciendo el blanco de hongo

13 **Blanco de hongo de grano de diez minutos**

14 **Inoculando paja sin blanco de hongo**

- Cómo preparar el inóculo
- Notas sobre el protocolo
- El problema de la senescencia

Preparación Substrato en Masa

16 Preparando paja con peróxido a temperatura ambiente

Ventajas de la preparación de paja con peróxido

¿Qué sobre las enzimas?

Protocolo para preparar paja u otros sustratos drenables

Notas sobre el protocolo

18 Preparando virutas de Madera Cruda con Peróxido

20 El Método de "Agregar-y-agitar" para Sustratos Compatibles con Peróxido

La razón y ventajas del método de "Agregar-y-agitar"

Aserrín secado al horno como sustrato

El protocolo aplicado a pellet de madera combustible a temperatura ambiente

Suplementos naturales de nitrógeno para usar con el protocolo

Cuánta agua agregar

Cuánto peróxido usar

Haciendo el Blanco de hongo por el método de "agregar-y-agitar"

23 Conclusión

Sobre el autor

Sobre el Traductor

Introducción

He escrito este segundo volumen de mi manual, *Cultivando Hongos de Manera Fácil*, tanto para rellenar algunos de los huecos en el primer volumen, como para introducir algunas ideas nuevas para ahorrar tiempo, esfuerzo, y dinero en el proceso del cultivo de hongos.

Como en el primer volumen, la mayoría de los métodos en este segundo volumen han sido diseñados principalmente para el cultivo en pequeña escala y en el hogar. Pero yo diseñé los primeros dos métodos para preparar sustrato en masa específicamente para productores que quieran trabajar a escalas comerciales. Y casi todas las técnicas restantes presentadas aquí también podrían ser de utilidad en un contexto comercial.

Los procedimientos están organizados dentro del volumen, según la fase del cultivo de hongos a la que ellos se aplican. Así, las técnicas que se relacionan al mantenimiento de cultivos y a la germinación de esporas vienen primero, luego sigue el método para preparar blanco de hongo y se termina con los procedimientos para preparar sustrato en masa.

Los procedimientos en este volumen son mayormente autosuficientes para los cultivadores familiarizados con el método del peróxido. Pero si usted es un principiante, deberá referirse al primer volumen de *Cultivando Hongos de Manera Fácil* que tiene la información esencial de base sobre el cultivo de hongos en general y en particular sobre el uso de peróxido de hidrógeno en el cultivo del hongo.

Los métodos basados en el peróxido presentados en este volumen son mis invenciones originales a menos que especifique lo contrario. En general, los métodos no basados en peróxido han sido elaborados por otros autores y ya son de dominio público. Yo estoy presentándolos aquí debido a su valor obvio para los productores de hongos que usan el método del peróxido.

¡Está dicho lo suficiente--comencemos!

Adquisición, Almacenamiento y Mantenimiento de Cultivos de Hongos

Usando agar en pico de flauta en lugar de las placas de agar

El cultivo de tejidos de hongo en placas de Petri con medio de agar ha sido por mucho tiempo el procedimiento estándar en micología. Pero a medida que más y más personas buscan cultivar hongos sin laboratorios estériles, este estándar ha sido cuestionado. Quizás el inconveniente más grande del cultivo de hongos en placas de Petri es que éstas tienen una superficie expuesta muy grande, y como son incubadas por tan largo tiempo, la oportunidad de recoger contaminación aérea es alta. Incluso con peróxido en el agar, las colonias de moho aparecerán de vez en cuando en el borde de las placas, especialmente después que el micelio se ha extendido sobre la mayor parte del agar, y en especial durante la "estación del moho" en el otoño.

Una solución a los problemas del cultivo en agar en cajas de Petri es cambiar al cultivo en agar en recipientes que tengan un área superficial expuesta más pequeña. Por ejemplo, los tubos de ensayo con tapa a rosca son una buena opción (las dimensiones típicas son de 19 x 125 mm). Cuando estos tubos se llenan parcialmente con medio de agar fundido y se permite su solidificación en ángulo, se obtiene agar en “pico de flauta”.

Las tubos con agar en pico de flauta son relativamente fáciles de manejar y mantener. También es fácil sostener las bocas de los tubos encima de la llama de una lámpara de alcohol por un momento al abrirlos y cerrarlos. Esto brinda seguridad extra contra los contaminantes. El agua en estos tubos se evapora mucho más despacio que en las placas de Petri, por lo que la concentración del peróxido permanece en un nivel eficaz por más tiempo. Incluso sin el peróxido, la proporción de contaminación es baja. Más aún, los tubos con agar en pico de flauta usan menos agar que las cajas de Petri, y así le ahorran dinero. Pero hay un lado negativo. A algunos hongos no les gusta el ambiente más húmedo del agar en pico de flauta (por ejemplo, *H. ulmarius*). No se puede supervisar la morfología del micelio tan detalladamente en agar en pico de flauta como en las placas de agar (los cambios en morfología pueden indicar contaminación u otros problemas de la cepa). Y puede ser frustrante y difícil sacar trozos de micelio desde el agar en pico de flauta cuando se quiera inocular otros medios de cultivo (esto depende bastante del tipo de trama de micelio que cada hongo produce).

Haciendo agar en pico de flauta

Aquí está cómo hacer varios tubos de agar en pico de flauta:

1. Mida los ingredientes para el medio de MYA en una lata de metal limpia. (Vea debajo para detalles del medio MYA--250 ml harán aproximadamente 20 tubos). Doble parte del borde en el margen de la lata para servir después como un pico de vertido.
2. Ponga un pedazo de lamina de aluminio encima de la boca de la lata y ponga la lata en una olla a presión con un poco de agua. Al mismo tiempo ponga sus tubos de tapa a rosca, pueden ser ubicados dentro de otra lata.
3. Haga circular vapor fluente durante 10 minutos sin el peso (regulador de presión) en su lugar. Entonces coloque el peso, lleve la olla a máxima presión, y cocine durante 10 minutos más.
4. Quite la olla inmediatamente del calor y deje enfriar. Abra la olla en cuanto la presión haya bajado. Saque la lata y los tubos para enfriar. Puede poner la lata en una cacerola de agua tibia para acelerar el enfriamiento, pero no permita que empiece a solidificar.
5. Agregue 1.5 ml de peróxido para 250 ml de medio MYA. Agregue peróxido con una pipeta pasteurizada (esto es, una pipeta que se haya sumergido brevemente en agua hirviente). Mezcle el peróxido haciendo un movimiento circular con la lata.
6. Finalmente vierta el agar en los tubos. Use el pico de vertido de la lata para hacer entrar el agar en las bocas estrechas de los tubos. Evite salpicar en las ranuras del tubo. Sostenga la tapa a rosca en el dedo meñique doblado de su mano dominante mientras hace el vertido.
7. Coloque cada tapa y ponga cada tubo inclinado en un ángulo agudo para la solidificación. Una fuente ancha y baja sirve bien para este propósito. Cuando el agar haya solidificado, los tubos están listos para usar.

Para una referencia fácil, aquí está la receta que uso para el Medio MYA:

12 g agar
 12 g polvo liviano de malta
 1 g polvo nutritivo de levadura
 0.5 g harina de grano (yo cambio entre el trigo, centeno, maíz, arroz, avena y mijo)
 0.5 g alimento de conejo (u otros pellets de alimento para animal)
 4-5 g pellets combustible de madera (la cantidad de pellets de madera puede aumentarse para esas especies que descomponen madera y que crecen pobremente en agar)
 1 litro de agua corriente
 Ajuste el pH a 6-8 con una pizca de polvo de hornear o vinagre (optativo)

Haciendo transferencias a y desde los agar en pico de flauta

Para inocular agar en pico de flauta, y para retirar micelio de ellos, ayuda tener un ansa de inoculación hecha de alambre duro. Usted puede fabricar su propia ansa de inoculación. Haga un pequeño lazo en el extremo de un alambre e inserte entonces el otro extremo del alambre en un tubo de vidrio delgado (1/8 pulgada, por ejemplo). Finalmente, use una llama para fundir el extremo del tubo de vidrio cerrado encima del alambre para sostenerlo en su lugar. El tubo de vidrio se vuelve el mango.

Para la inoculación exitosa, usted tendrá que sacar un trozo de agar con micelio y transferirlo al agar inclinado. Ésta puede ser una tarea algo tramposa con un ansa de inoculación. (Si el trozo es demasiado pequeño, o si usted simplemente raspa el micelio desde la superficie del agar, puede no ser capaz de establecerse. Pero si al principio no tiene éxito, siempre puede intentar de nuevo con el mismo agar inclinado, ya que el peróxido lo mantendrá libre de contaminantes). Me gusta undir el ansa en el agar para sacar un pedazo del cultivo, pero todavía puede ser difícil tomar un buen pedazo con el ansa. Muchas veces he arrancado el pedazo deseado sólo para dejarlo caer del ansa cuando lo movía para transferirlo. Pero eventualmente usted lo logrará. Ruede la boca del tubo sobre la llama de su lámpara del alcohol antes y después del traslado.

Limpiando el micelio con agar en pico de flauta

En el Volumen I de Cultivando Hongos de Manera Fácil, expliqué cómo la contaminación microbiana invisible puede crecer en el micelio cultivado por el método del peróxido. También presenté un método para "limpiar" los micelios de estos contaminantes, inoculando en el fondo del agar en cultivos en cajas de Petri. En los tubos con agar en pico de flauta, los contaminantes invisibles deberían crecer un poco más despacio que en las placas de Petri, pero eventualmente se acumularán al punto donde el micelio necesite una limpieza. No hay, sin embargo, una manera conveniente de inocular el fondo del agar, de modo que deberemos usar un método diferente. Este método consiste en verter una segunda capa de agar--cuando esté casi tan frío como para solidificar--encima del micelio que crece en la primera capa de agar. El micelio entonces crece a través de la segunda capa y se limpia a medida que lo hace.

Aquí está cómo hacerlo:

1) Prepare e inocule agar en pico de flauta como se describió anteriormente. Permita que el micelio crezca un poco por encima del agar.

2) Prepare una cantidad pequeña de medio MYA por el procedimiento estándar, pero para contener el medio use una lata con un doblez en el margen para formar un pico de vertido (como antes para hacer agar en pico de flauta). Cúbralo con lamina de aluminio.

3) Después de cocinar, cuando el medio se haya enfriado substancialmente, agregue peróxido a la concentración usual y mezcle completamente con movimiento circular suave.

4) cuando el fondo de la lata esté apenas tibio al tacto, encienda su lámpara del alcohol. Abra un tubo con agar inclinado y sostenga la tapa en la curvatura de su dedo meñique. Gire la boca del tubo encima de la llama de la lámpara de alcohol, y después coloque suficiente medio del agar nuevo en el tubo para cubrir el micelio completamente. Usted puede cubrir el micelio con el tubo inclinado o con el tubo derecho. Cuanto menos agar use, menor será la distancia que el micelio tendrá que crecer para alcanzar la superficie. ¡Tenga cuidado! El agar restante en la lata tiende a solidificar bastante rápido, así que póngalo en una cacerola con agua tibia.

5) Coloque la tapa a rosca del tubo.

6) Permita que el micelio crezca a través de la nueva capa de agar.

Al sacar micelio para las inoculaciones, tenga cuidado de no atravesar toda la capa superior del agar y llegar a la capa inferior. Si lo hace, anulará el propósito del método de las capas de agar.

Medio basado en cerveza (MBC)

Aquí hay un medio para hacer placas de agar que ahorra la mayoría de las pesadas y mediciones. También es perfecto para quienes no pueden encontrar una fuente de extracto de malta. Y aun cuando usted pueda, la malta en polvo puede ponerse dura como piedra durante el almacenamiento. Este medio saltea ese problema. Viene a usted por la cortesía del Dr. Nenad Vidovic y de la Corporación Sansin de Ontario, Canadá (vea *Vidovic, N., Specialty Mushrooms--Small Scale Production, Mycelium, 25, 1999*, páginas 4 y 8). El Dr. Vidovic demostró que varias especies de hongos pueden crecer en MBC tan bien como lo hacen en medio de agar con extracto de malta comercial. Yo he modificado su receta para incluir el peróxido.

Ingredientes:

1 parte de cerveza nueva

3 partes agua

2% agar en peso (2 g de agar en polvo para 100 ml de medio, o 1 cucharita de té para 1/2 taza)

6 Mezcle la cerveza y el agua.

7 Agregue el agar.

8 Esterilice en un olla a presión máxima (15 psi) después de permitir 10 minutos de fluencia de vapor para disolver el agar.

9 Enfríe hasta que el recipiente pueda ser manejado. Luego agregue peróxido (6 ml por litro, de 3%), mezcle bien, y distribuya el medio en las placas del petri estériles.

El Dr. Vidovic también informa que el MBC estéril sin el agar es un excelente medio del almacenamiento. Él lo llama MLBC, por "medio líquido basado en cerveza". Los cultivos de ambos hongos los ostra (*Pleurotus ostreatus*) y las morellas (especies de *Morchella*) eran fácilmente recuperables después de dos años en MLBC (sin peróxido). También funciona bien para la germinación de esporas.

Empezando con esporas

Usualmente insto a los futuros cultivadores de hongos a que empiecen sus exploraciones con cultivos de tejido establecidos y saludables, de las especies de hongo que quieran cultivar. Éstos deben obtenerse de proveedores de cultivos de hongos de buena reputación. Tales cultivos han sido probados y se ha mostrado que producen buenos rendimientos de hongos bajo ciertas condiciones reproducibles. A menos que el cultivo sea repetidamente dañado, continuará produciendo buenos rendimientos de hongos cuando usted proporcione las condiciones correctas. Y si usted pierde el cultivo, puede (en la mayoría de los casos) ir de vuelta a su proveedor y obtener otra copia que producirá hongos bajo las mismas condiciones que anduvieron bien para el cultivo anterior. Por el contrario, si usted empieza con esporas, no hay ninguna seguridad de que el cultivo de micelio que usted cultive a partir de ellas fructificará en cantidades adecuadas. Tampoco hay seguridad de que los hongos producidos tendrán las características del hongo del que vinieron las esporas. Es más, usted no conocerá las condiciones óptimas de crecimiento para la cepa que usted obtiene por germinación de la espora hasta que la haya ensayado. Y si usted pierde el cultivo, tendrá que volver a empezar de nuevo desde el principio.

Sin embargo, hay argumentos por el otro lado. Los cultivos obtenidos por germinación de esporas a menudo son bastante vigorosos. Con especies que crecen rápidamente como los hongos ostra, las diferencias entre el hongo genitor y la descendencia producida desde la espora es a menudo pequeña. Las esporas pueden costar poco o nada, mientras que los cultivos de tejido pueden ser caros. Las esporas pueden obtenerse de los hongos secos mientras que los cultivos de tejido no. Y así sucesivamente. De manera que vale la pena tener un método simple para germinar esporas.

En ediciones anteriores del manual del peróxido, yo insistí en que las esporas no podían germinarse en medio de peróxido. Pero un par de personas me escribieron para decirme que de hecho ellas habían germinado esporas en presencia de peróxido. Así que ahora tengo que reconocer que sí, que puede hacerse. Generalmente se debe tener que aplicar un concentrado de millones de esporas sobre la superficie del medio de peróxido, pero puede hacerse. Todavía no estoy convencido de que sea una buena idea para el uso rutinario. El micelio generado de esta manera podría muy fácilmente estar dañado genéticamente. Y en realidad, no es muy difícil empezar cultivos limpios desde las esporas en ausencia de peróxido, incluso en un ambiente no-estéril. Un método bueno es empezar con las esporas en tubos con tapa a rosca y agar inclinado, así la oportunidad de que entre contaminación desde el aire es reducida en comparación a las placas de Petri (muchas gracias a David Sar por permitirme conocer sobre esta posibilidad).

Recolección de esporas

Aquí hay un modo de coleccionar esporas:

- 7 Cocine a presión unas placas de Petri durante unos 15 minutos en un recipiente cubierto. Permita que las placas se enfríen.
- 8 Escoja un hongo maduro para su fuente de esporas. Si posible, escoja uno limpio que probablemente no esté cubierto con esporas de moho.

- 9 Desocupe una mesada en alguna parte de su casa donde no haya demasiadas corrientes de aire ocasionadas por personas que caminan cerca. Limpie la mesada con una esponja y luego límpiela con alcohol de frotar.
- 10 Abra una de sus placas de Petri (usted simplemente puede poner la tapa, con su superficie superior hacia arriba, al lado de la placa en la mesada), y coloque su hongo encima de la placa. Si el hongo es suficientemente grande, puede cubrir el fondo entero de la placa de Petri. O quizás usted tiene un racimo que puede abarcar la placa. Los hongos más pequeños, o los hongos con formas irregulares como el morella, pueden suspenderse sobre la placa por un hilo. Use su imaginación. Usted debería evitar que el hongo toque el interior del fondo de la placa de Petri y que a su vez la placa no esté expuesta demasiado a los contaminantes aéreos. Pero debe disponer el hongo de manera tal que sus esporas puedan caer en el interior de la placa.
- 11 Prosiga y colecciona esporas, idealmente hasta que usted tenga una capa visible de "polvo" de esporas en la placa. Esto tarda aproximadamente una hora para productores copiosos de esporas como los hongos ostra. Pero podría llevar varias horas para algunas especies de hongos, y para otras nunca conseguirá una capa visible. Cuando termine, cierre la placa de Petri.

Germinación de esporas por el método del disco

Aquí está mi método favorito para germinar esporas. No usa ni agar ni peróxido. Usted pondrá esporas sobre un disco pequeño de cartón, luego inserte el disco en un tubo de ensayo estéril con tapa a rosca. Las esporas germinarán en unas pocas gotas de medio nutritivo en el tubo. Yo he usado este método con éxito para germinar esporas de shiitake, portobello, hongo almendra, ostra del olmo, y Pleurotus.

Esto es lo que usted hace:

- 28 Prepare algunos discos pequeños haciendo agujeros al azar en un pedazo de cartón gris (no-corrugado). Haga esto con una agujereadora para papel, conservando los círculos que se van cortando.
- 29 Prepare aproximadamente 10 ml de solución de MBC (sin el agar).
- 30 Reúna un juego de tubos de ensayo (de 19 x 125 mm) con tapa a rosca, limpios o recipientes similares de boca estrecha.
- 31 Coloque 5-10 gotas de la solución de MBC en cada tubo.
- 32 Ponga los discos de cartón en una placa de petri o en un frasco pequeño con tapa y esterilice 10 minutos a 15 psi.
- 33 Al mismo tiempo, esterilice los tubos de tapa a rosca con la solución MBC en ellos. Después que se hayan enfriado, los tubos tendrán una pequeña cantidad de líquido en su fondo.
- 34 Una vez que todo está estéril y frío, esterilice una pinza sobre la llama. Úsela para arrastrar uno de los discos a través de las esporas que usted ha coleccionado (o colecte directamente sus esporas en el recipiente estéril con discos de cartón).
- 35 Suelte cada disco cargado con esporas dentro de un tubo estéril (flamee la boca del tubo al abrir y cerrar). Asegúrese de que el disco baje y entre en el medio líquido remanente. El disco debe estar mojado para una buena germinación de las esporas. Enrosque las tapas ajustadamente. Prepare así varios tubos (réplicas).
- 36 Usted deberá impedir que los tubos se sequen. Esto es especialmente importante para especies de germinación lenta como shiitake o champignones. Para estas especies, ponga los tubos dentro de un recipiente más grande, con tapa. Agregue un poco de agua al recipiente y cierre la tapa.

- 37 Incube. Cambie el agua en el recipiente más grande si ve que se pone fea.
- 38 Examine periódicamente los discos en los tubos por pequeñas señales de pelusa blanca (micelio). Deseche los cultivos que contengan moho o bacteria. (El moho verde y azul-verde crecerá rápidamente en racimos redondeados. Éstos son blancos al principio y luego desarrollan un centro coloreado. Las bacterias causarán que el líquido se vuelva turbio.
- 39 Una vez que ha obtenido algún micelio, cambie el disco a una placa o agar inclinado con peróxido. Puede hacer esto con una pinza esterilizada a la llama, o puede hacer resbalar el disco hacia afuera con un ansa de inoculación esterilizada a la llama.
- 40 Incube y permita que el micelio crezca. El crecimiento será lento, ya que el micelio tiene que adaptarse al peróxido.

El color oscuro de los discos de cartón ayuda a revelar el micelio color claro cuando aparece. Pero esté advertido de que los mechones de micelio a veces pueden ser muy difíciles de verse al principio. En una placa con agar tratado con peróxido, usted puede observar el halo de crecimiento formado por el micelio que se extiende. El micelio puede no ser homogéneo, o puede llevar contaminantes. En ese caso, el halo mostrará sectores que crecen a diferentes velocidades y con apariencias diferentes. Entonces usted puede extraer micelio del sector que aparenta estar bueno para transferirlo a placas nuevas. Los mejores sectores deberían tener un crecimiento radial bueno, o un crecimiento rizomórfico serpenteante. El micelio algodonoso generalmente se debe vitar, pero puede ser normal para algunas especies. Una vez que usted tiene un micelio estable sin -sectorización, ya está listo para hacer blanco y probar su cepa en el substrato. ¡Y no se olvide de hacer cultivos para almacenar!

Ideas hacia el cultivo de micelio sin agar

El agar es probablemente el ingrediente más caro usado en el cultivo de hongos. Es relativamente simple de manejar una vez que haya aprendido sobre él. Pero muchos cultivadores de hongos principiantes evitan obtener sus propios cultivos debido a su desconocimiento en el uso del agar. Por ello he estado pensando sobre alternativas. Aquí sugiero una simple opción que es prometedora como alternativa al medio de agar --es el cultivo en disco de cartón gris. El cartón gris es barato y fácilmente disponible. (También pueden usarse otros colores de cartón no-corrugado). Y siempre que esté limpio, no contendrá ninguna enzima que descompone peróxido. Al contrario del cartón corrugado, el cartón gris se moja fácilmente, y el material húmedo es suficientemente suave como para retirar trozos para las transferencias. También es un buen substrato para el crecimiento de micelio de hongo, a menudo favoreciendo un crecimiento rápido incluso cuando muy limitadas cantidades de otros nutrientes están presentes. Y es muy simple agregar una solución nutritiva si usted lo necesita.

De modo que, en lugar de pasar por todo el problema de tener que pesar los ingredientes para el medio de agar, fundir el agar, enfriarlo despacio, agregar el peróxido, verter en las placas, esperar hasta que solidifique el agar, luego dejar secar las placas durante un par de días, usted simplemente puede cortar discos de cartón gris de manera que encajen en su placa de Petri o frascos, y preparar un frasco de agua o una solución nutriente simple. Entonces, esponga las placas y el frasco de líquido al vapor fluente en la olla a presión durante 10 minutos. Enfríe rápidamente, y agregue peróxido al líquido del frasco. Finalmente, sumerja el cartón en el líquido para darle la protección del peróxido. Las placas de cartón están entonces listas para usarse en cuanto se hayan empapado en la solución.

Donde el cartón gris sea un suministro escaso, el papel de periódico es un sustituto posible, pero tiene varios inconvenientes comparado con el cartón. En primer lugar, puede ser difícil ver el micelio, particularmente si el papel de periódico es de color claro. Por otro lado el micelio puede ser tan sutil como un tejido de araña cuando está creciendo en papel de periódico. Para complicar las cosas se puede extender más debajo de la superficie, fuera de la vista, que a plena vista. Es más, el crecimiento raramente desarrolla en un buen halo redondo como uno lo obtiene sobre agar. Ni necesariamente progresa uniformemente de una capa de papel de periódico a la próxima. En cambio, el micelio puede extenderse algo caprichosamente. Al parecer es influenciado por pequeñas variaciones en las condiciones que encuentra entre las capas del papel de periódico.

Yo todavía no sé si el micelio puede transferirse repetidamente sobre cartón no suplementado sin encontrarse con limitaciones nutritivas. Yo esperarí que el cartón estuviera casi desprovisto de nitrógeno. De manera que hasta nuevo aviso, probablemente es una buena idea agregar una solución nutritiva para mantener su micelio corriendo en los discos de cartón.

Cómo preparar las placas

Aquí están los pasos detallados para hacer las placas de cartón. Note que también puede usar frascos pequeños en lugar de las placas de Petri.

- 28 Mida aproximadamente 250 ml de agua corriente en un frasco pequeño. Si usted quiere agregar nutrientes a las placas use MBC (descripto anteriormente).
- 29 Encuentre algún cartón gris, el más espeso es mejor, preferentemente gris en ambos lados. Dibuje el contorno de las placas de Petri sobre el cartón con un lápiz. Recorte varios discos algo más pequeños que el trazado.
- 30 Reúna un juego de placas de petri, por lo menos una más que el número de discos que usted tiene.
- 31 Humedezca los discos ligeramente: sumerja cada uno en agua corriente e inmediatamente sacúdalo. Entonces encierre los discos dentro de las placas.
- 32 esterilice a presión el frasco de líquido y las cajas de Petri, incluso la vacía, durante 10 minutos a 15 psi (permita que la olla equilibre el vapor fluente durante 10 minutos antes de colocarle el regulador de presión).
- 33 Enfríe la olla, y retire las placas y el frasco de líquido.
- 34 Cuando el líquido se haya enfriado, agregue al frasco 1.5 ml de peróxido 3%. Use una pipeta de medición que se haya sumergido en agua hirviente. Usted tendrá una concentración final de aproximadamente 0.018% de peróxido en el líquido estéril.
- 35 Vierta un poco de la solución de peróxido diluida en la caja de Petri vacía que usted esterilizó. Esto servirá como un depósito de inmersión, para mojar los discos de cartón.
- 36 Esterilice el extremo de un par de pinzas en una llama. Use las pinzas para transferir los discos del cartón de uno a la vez al depósito de inmersión de la solución diluida de peróxido. Permita que la solución empape brevemente a los discos. Entonces quite cada uno y transfíeralo de vuelta a la placa de Petri de la que vino.
- 37 Las placas con los discos ya están listos para usar.

Usted puede mantener e incubar estas placas dentro bolsas de plástico del tipo de guardar alimentos como sugiero en el Volumen I para las placas de agar. Pero probablemente verá que sus discos de cartón se secan demasiado rápidamente. Puede mantenerlos húmedos por mayor tiempo guardándolos en un recipiente cerrado que

tiene un poco de la solución de peróxido en el fondo. Por ejemplo, encuentre un recipiente de plástico para helado o un frasco con una boca suficientemente ancha para permitir que pasen las cajas de Petri. Entonces cree una plataforma para sostener sus placas de Petri alejadas del fondo del recipiente, quizás poniendo un frasco más pequeño dentro del recipiente más grande. Ponga las cajas de Petri encima de la plataforma.

Luego agregue al recipiente una pequeña cantidad de solución de peróxido con la misma concentración que usa para sus placas (aproximadamente 0.018%). Finalmente, cubra el recipiente con una capa de envoltura de plástico y fijéla en su lugar con una banda de goma alrededor de la boca del recipiente (este tipo de cierre permitirá una adecuada difusión de oxígeno). Cuide el armado del dispositivo de manera de no tirar las cajas de Petri fuera de la plataforma y adentro del agua.

Haciendo transferencias

Ahora probablemente se está preguntando cómo obtendrá las cuñas de cartón cuando deba hacer un traslado desde una de estas placas. Bien, usted no cortará cuñas, pero aquí está el truco: fácilmente puede raspar material desde la superficie de los discos húmedos usando la punta de un bisturí estéril. Simplemente arrastre la punta del bisturí firmemente de costado por la superficie de un sector del cartón, unas pocas veces. Los raspados pueden entonces transferirse a otra placa o a un frasco de blanco de hongo con el bisturí. Al raspar de esta manera, la dobleces del cartón arrugado obstruyen demasiado la remoción de material desde la superficie.

Limpiando el micelio

Como expliqué en el Volumen I y antes en la sección del agar en pico de flauta, los contaminantes invisibles del aire pueden aparecer en la superficie de micelio que ha sido crecido en placas con peróxido. Eso ocurre porque el peróxido protege el medio pero no el micelio. Los contaminantes invisibles deben ser limpiados periódicamente. De otra manera ellos se multiplicarán en el blanco de hongo o en los cultivos en fructificación. El micelio crecido en cartón no es una excepción.

Con los cultivos en agar, nosotros limpiamos el micelio con un procedimiento bastante complicado. Esto requirió separar y llevar el disco de agar desde el fondo de la placa de Petri a la tapa, luego inocular el fondo de agar, devolviendo entonces el disco de agar a su lugar original. Esto obligó al micelio a crecer a través del medio y dejar atrás los contaminantes. Aunque esto funciona, también aumenta la proporción de fracaso por semejante maniobra. Con el cartón, es fácil de inocular el fondo del disco: simplemente de vuelta la placa. Entonces el disco cae en la tapa y el fondo del disco es expuesto. Simplemente transfiera una muestra de micelio a la superficie expuesta con un bisturí esterilizado a la llama, cierre la placa, y vuélvala a dar vuelta. ¡Y ya está! Pero si bien resulta, el micelio toma un tiempo sorprendentemente largo para crecer a través del disco. En cambio prefiere extenderse lateralmente. De modo que en lugar de esperar que el micelio crezca hacia la parte superior, nosotros simplemente podemos permitirle extenderse en el fondo del disco. Siempre que no se lo disturbe, el micelio crecerá completamente por debajo de la tapa de cartón. De esta manera tiene muy poca exposición a los contaminantes del aire. Esto por sí mismo debería mantener el micelio limpio, sobre todo si el disco de cartón se asienta casi plano en el fondo de la placa. Si usted rutinariamente inocula sus placas de esta manera, y toma material

hacia el borde del halo del micelio para sus transferencias, es de esperar que tenga poco problema con la acumulación de contaminantes invisibles. Usted puede tener dificultad en asentar sus discos en forma aplanada en el fondo de sus placas de Petri. En este caso, puede tener mejor suerte creando un sandwich de cartón con dos discos estériles humedecidos en peróxido. Entonces, puede inocular el interior del sandwich, entre los discos. El micelio crecerá totalmente dentro del bocadillo, manteniéndose libre de contaminación aérea. La sequedad de la superficie del cartón sobre ambos lados del micelio, además, debería descorazonar la difusión de bacterias y levaduras. De manera que el micelio debería limpiarse a medida que se extiende lateralmente dentro del bocadillo. Cuando quiera llegar al micelio protegido dentro del bocadillo, separe los pedazos de cartón. Pero usted no podrá ver cuánto ha crecido el micelio sin abrirlo. Así que tendrá que tener cuidado de fechar sus cultivos. Entonces estará seguro de haber permitido suficiente tiempo para que el micelio crezca antes de que usted abra el sandwich.

Almacenamiento de cultivo sin agar

Para el almacenamiento de micelio a largo plazo, me gusta usar pellets de fibra de papel cargados en los tubos de ensayo con tapa a rosca. Esto es lo que hago:

1. Pongo aproximadamente 28 g de pellets de fibra de papel o aserrín en un cuenco pequeño o una lata.
2. Agrego aproximadamente 25 ml (2 cucharadas) de agua hirviente a los pellets.
3. Rompo a los pellets en pedazos pequeños con un tenedor o algo similar.
4. Cargo el substrato en los tubos de ensayo con tapa a rosca, llenando hasta cerca de la mitad. Para hacerlo, pongo algo de material en una cucharita de te, y sostengo esto en la boca del tubo. Entonces uso un dedo para apretar algunas de las partículas a través de la apertura. Es un proceso desprolijo.
5. Coloco las tapas en los tubos y esterilizo a presión durante 10 minutos. Dejo enfriar.
6. Inoculo cada tubo con un pedacito de cultivo de agar. Al abrir y cerrar, giro la boca del tubo en una llama.
7. Almaceno los tubos inoculados en un lugar fresco (o a la temperatura ambiente para las especies de habitats templados).

El micelio colonizará el substrato lentamente. Entonces, cuando usted necesite una muestra de tejido nueva, saque un tubo. Puede aflojar unos pocos pedacitos del substrato colonizado por medio de un ansa de inoculación o de un bisturí. Entonces suéltelos sobre el nuevo medio. Finalmente, vuelva a almacenar el tubo para usarlo otra vez.

Sólo he tenido un tiempo limitado para determinar cuán bien se mantienen estos cultivos en un almacenamiento a largo plazo. Pero sospecho que lo harán mejor que los cultivos de agar. La fibra de papel y el cartón se parecen más estrechamente al substrato natural para el micelio del hongo que el agar. Y si usted no agrega ninguna solución nutritiva, la fibra de papel estará baja en nutrientes. Esto es lo que usualmente se recomienda para los cultivos en almacenamiento. Ello estimula algo similar a un estado de dormición. También previene una acumulación de productos de desecho tóxicos que el micelio produciría en un medio más rico en almacenamiento de largo plazo. Al mismo tiempo, algunas especies, como los ostras, no andan bien en un almacenamiento húmedo (es decir, en agua destilada o en agar en pico de flauta). Estas especies pueden encontrar la fibra del papel o el medio de aserrín más a su gusto, ya que tienen una característica más seca. Además, los cultivos en fibra de

papel de cepas tolerantes al frío, como aquéllas de hongos ostra, pueden congelarse fácilmente.

Enviando cultivos por correo

Los cultivos tipo sandwich de cartón pueden almacenarse fácilmente en bolsitas de plástico con cierre a cremallera, y también pueden mandarse por correo de esta manera. Haga un sandwich de micelio entre dos discos delgados de cartón gris (como el de caja de cereal) que se han esterilizado y se han humedecido con solución de peróxido. (El lado coloreado del cartón queda hacia afuera. Esto ayuda a mantener la humedad y preserva de potenciales contaminantes.) Entonces, con una pinza, introduzca este sandwich en la bolsita con cierre de cremallera más pequeña que usted pueda encontrar. Cierre la cremallera, y permita que el micelio crezca durante unos días. (Cuidado: los sandwich pueden secarse rápidamente. Para prevenir esto, póngalos en un recipiente más grande con un poco de agua. Por ejemplo, agregue una pequeña cantidad de agua a un recipiente plástico. Ponga las bolsitas con cierre a cremallera en el recipiente con el cierre afuera del agua. Cierre la tapa del recipiente e incube. Cambie el agua si se estropea.) En lugar de una bolsa con cremallera, usted puede usar también una bolsa común de plástico de guardar alimentos. Corte una sección de una esquina de la bolsa, pliegúela pulcramente, y ciérrela con cinta. Finalmente, envíe su cultivo por el correo. El destinatario al otro extremo solamente necesitará transferir el micelio a una placa nueva. Para hacer para esto, él o ella necesitará retirar el sandwich y ponerlo en una placa de Petri o frasco estéril. Entonces separarán el sandwich abriendo con pinzas para llegar al micelio el que se ha mantenido limpio y protegido en el interior.

Este método de enviar cultivos en sobres ordinarios probablemente se limita a especies cuyos micelios pueden tolerar las bajas temperaturas de la bodega de un avión jet. Las especies que prefieren temperaturas cálidas- como el champignon almendra (Agaricus subrufescens) pueden necesitar empaques en recipientes aislados para impedir que se congelen.

Re-esterilizando placas de Petri descartables con peróxido

Hay una manera de re-usar esas placas de petri de plástico descartables. Por supuesto, también puede esterilizar otros recipientes esta manera.

- 1) Lave cada placa y cuidando de quitar el agar viejo. Enjuague.
 - 2) Vierta un poco de peróxido 3% nuevo y y mueva el líquido dentro de cada placa.
 - 3) coloque las placas en el microonda y caliente hasta que todo el peróxido se ha ido. El empleo de una potencia exacta no importaría mucho.
- Ahora las placas de petri están estériles y pueden usarse para verter medio.

Me han escrito señalando que ese microondeado debería por sí mismo esterilizar estas cajas de Petri, sin el peróxido. Yo señalé a su vez que ese peróxido solo debería esterilizarlas también (y esto podría serle útil si usted no tiene un horno microonda). Los dos tratamientos combinados proporcionan un margen extra de seguridad.

Preparación de Blanco

Blanco en bolsas de plástico -- "Blanco de Hongo de Ocho Minutos"

En Cultivando Hongos de Manera Fácil, presenté un procedimiento para preparar rápida y fácilmente blanco de hongo basado en pellet combustible usando frascos de vidrio como recipientes. Éste es todavía mi método preferido para hacer el blanco de hongo. Pero he preparado algunas variaciones de este método para que pueda adaptarse a situaciones diferentes.

Por ejemplo, quizás usted no tiene una colección de frascos, pero puede conseguir fácilmente bolsas de plástico transparente nuevas ("bolsas para guardar alimentos "). Usted puede usar estas bolsas como recipientes para el blanco de hongo --de hecho, ofrecen ciertas ventajas sobre los frascos. En primer lugar, al usar bolsas no es necesario agregar pellets de fibra de papel a la receta del blanco de hongo. Esto simplifica el proceso de la formulación, ahorra dinero, y al mismo tiempo le proporciona un blanco más finamente dividido. (Los pellets estaban allí para hacer posible separar el blanco de hongo agitando los frascos. Con las bolsas de plástico, usted puede separar el blanco de hongo manipulando las bolsas). Por otra parte, el intercambio de aire en las bolsas de plástico parece ser mayor que en los frascos. El oxígeno puede entrar directamente a través del plástico pero no a través del vidrio. De alguna manera, esto acelera el crecimiento del blanco de hongo en las bolsas de plástico. Además, las bolsas con blanco de hongo se calientan y enfrían más rápidamente que los frascos, de modo que el proceso de calentamiento con vapor puede completarse más rápidamente. Las bolsas también ahorran la dificultad de preparar a los discos de cartón para encajar en las tapas del frasco, y de la limpieza de los frascos. Y finalmente, las bolsas le permiten oler el blanco de hongo sin tener que abrirlas. La fragancia escapa a través del plástico. Esto le permite una manera de controlar la pureza del blanco de hongo más que simplemente mirarlo. La contaminación bacteriana y de moho introducirá un olor agrio o mohoso, y cada especie de hongo tiene una fragancia característica.

En el otro lado de la ecuación, las bolsas crean un desecho no-biodegradable (aunque ellas pueden lavarse y re-usarse). Las bolsas también pueden tener agujeros del tamaño de un alfiler que usted no puede ver. Y no son especialmente convenientes cuando se quiere retirar sólo una porción pequeña del blanco de hongo a la vez (con los frascos, usted puede quitar la tapa, traspasar algo de blanco de hongo a otro recipiente, y volver a colocar la tapa). Por la última razón, yo todavía hago mis blancos de hongo maestro (el que uso para inocular blanco de hongo adicional) en frascos.

Haciendo el blanco de hongo

Aquí hay una receta para preparar seis bolsas pequeñas de blanco de hongo de ocho minutos, cada una justo del tamaño correcto para inocular un balde de 20 litros del pellet combustible o aproximadamente 3 - 4,5 Kg de peso seco de substrato.

624 g de pellet combustible (u otro material compatible con el peróxido)

3-4 cucharadas (45-60 ml) de suplemento de nitrógeno compatible con peróxido (vea el Volumen I para las opciones)

11.4 g de caliza en polvo o caliza de cáscara de ostra

5,7 g de yeso (sulfato del calcio)

990 ml de agua corriente caliente

110 ml de peróxido de hidrógeno 3%

- 1) Mida el pellet combustible en un balde u olla. Agregue los ingredientes líquidos y permita absorber el agua.
- 2) Agregue los ingredientes secos restantes y mézclelos completamente con una cuchara o espátula. Siga mezclando hasta que los pellets se hayan desagregado en aserrín.
- 3) Mida 250-280 g (o aproximadamente 2.75 tazas) del substrato resultante en seis bolsas transparentes de almacenar comida. Refuerza las bolsas para cerrar flojamente.
- 4) En una olla o lata grande coloque agua hasta unos 8 cm y caliente hasta franco hervor. Ponga alguna clase de soporte o difusor de calor en el fondo. Coloque de una vez todas las bolsas en el agua hirviente. Bájelas mientras sostiene unidos los cuellos de las bolsas.
- 5) Tape la olla y hierva durante 8 minutos.
- 6) Retire inmediatamente todas las bolsas y flótelas en agua fría en una cacerola ancha. Tenga cuidado y evite que las bocas de las bolsas entren en el agua.
- 7) Cuando las bolsas se hayan enfriado substancialmente, retírelas del agua. Ate las bocas de las bolsas a unos 3 cm del borde superior, con lazos de torsión.
- 8) Cuando las bolsas estén completamente frías, están listas para inocular.

Usando el blanco de hongo

Para usar su blanco de hongo en bolsa, separe el micelio el día anterior al que piensa inocular. Usted puede hacer esto manipulando (moviendo con las manos) la bolsa para convertir los grupos de micelio en grumos, y los grumos en partículas más pequeñas. Tenga cuidado de no pinchar la bolsa con sus uñas, o con el lazo de torsión. Al día siguiente, usted estará listo para sacar el blanco de hongo de estas bolsas. Sea consciente que las bocas de las bolsas no están estériles por encima de los lazos de torsión. Por eso no debe usarlas como picos de vertido. En cambio,

- 1) tire abriendo la boca de la bolsa asiendo desde las superficies externas
- 2) pliegue los bordes de la bolsa sobre sí misma, y
- 3) empuje el blanco de hongo hacia afuera mientras da vuelta la bolsa al revés.

"Blanco de Hongo en Grano de Diez Minutos"

Esta es una manera de preparar el blanco de hongo en grano sin usar una olla a presión: use "arroz moreno instantáneo", el cual carece de enzimas que descomponen el peróxido. Simplemente agregue agua, yeso en polvo, y peróxido al arroz, y cuézalo al vapor en un frasco o en una bolsa de plástico. Entonces enfríe, y está listo para inocular. La idea para este procedimiento viene a usted por cortesía de Rene Rikkelman.

- 1) Reúna un juego de frascos con tapas--o use bolsas nuevas de plástico (con lazo de torsión) para guardar alimentos.

- 2) Para los frascos, trace el círculo de las tapas sobre el cartón de caja de cereal (o un cartón delgado similar). Recorte discos algo más pequeños que el círculo marcado. Encaje un disco como este dentro de cada tapa de frasco. Más tarde, usted mojará estos discos con peróxido de hidrógeno, de manera que ellos servirán como una barrera para la contaminación. Si usted tiene tapas de dos piezas, los discos también ayudarán sostener juntas las tapas cuando usted las abre.
- 3) Consiga algo de "arroz moreno instantáneo" del almacén de comestibles. Krafts o Uncle Bens son marcas americanas muy conocidas. No hay mucho arroz en cada caja. El arroz común NO funcionará debido a las enzimas. El arroz BLANCO instantáneo no tiene suficiente nutrición en él para mantener algunas especies de hongo.
- 4) Ponga su arroz en un cuenco grande o tina de yogur. Agregue yeso en polvo, aproximadamente un gramo cada 200 mls. de arroz
- 5) En un recipiente tipo jarro, mida un volumen de agua corriente caliente por cada dos volúmenes de arroz que vaya a usar. Agregue suficiente solución de peróxido para hacer una concentración final de aproximadamente 0.15 a 0.20 por ciento (aproximadamente 0.06 volúmenes de peróxido 3%).
- 6) Agregue el líquido al arroz en el cuenco. Mezcle el arroz con una cuchara para que se moje con la solución. La mayoría del líquido será incorporada por el arroz. Simplemente revuélvalo de vez en cuando para mantenerlo distribuido en forma uniforme.
- 7) Cuando el arroz ha absorbido todo o la mayor parte del agua, divídalo entre los frascos o las bolsas. Llène los frascos aproximadamente a 2/3 de su capacidad. Enrosque las tapas con sus discos del cartón FLOJAMENTE sobre los frascos.
- 8) Para las bolsas, salte al punto 12) de abajo. Para los frascos, agregue aproximadamente hasta 2,5 cm de agua a una olla grande con tapa. La olla necesitará una rejilla o algo para evitar que los frascos se apoyen directamente en el fondo. Ponga los frascos en la olla con sus tapas flojamente en su lugar. Ponga la tapa de la olla en su lugar.
- 9) Lleve el agua de la olla a ebullición. Cuando ha alcanzado un consistente franco hervor, permita que continúe hirviendo por unos 10 minutos. Entonces inmediatamente retire los frascos de la olla a una superficie resistente al calor como una tabla de cortar. (PRECAUCIÓN: el vapor de la olla puede quemarlo, y los frascos también están calientes. Los guantes gruesos de caucho son muy útiles para remover y manejar los frascos en esta fase.)
- 10) Permita que los frascos se enfríen completamente.
- 11) Abra rápidamente cada tapa tratada con peróxido. Eche un poco de peróxido 3% sobre el disco de cartón dentro de la tapa. Moje el disco completamente. Sacuda cualquier exceso de peróxido en la pileta.
- 12) Para las bolsas de plástico, agregue hasta unos 8 cm de agua a la olla, y lleve a hervor. Ponga sus bolsas de arroz en la olla para que ellas floten en el agua hirviente (haga esto usando guantes gruesos de caucho para evitar quemaduras). Retuerza y enrolle flojamente los cuellos de las bolsas unos con otros. Asegúrese que ellas no se caigan en el agua. Vuelva a colocar la tapa en la olla y hierva por sólo 8 minutos.
- 13) Para que se enfríen rápidamente lleve las bolsas a una cacerola ancha con agua fría. Cuando estén fríos selle las bolsas con lazos de torsión.

Inoculando Paja sin el Blanco de Hongo

Aquí hay un truco para cultivar los hongos ostra sobre paja cuando usted no quiere hacer blanco de hongo. O quizá sólo quiera probar algo diferente: inocular paja con

hongos picados. Yo sólo he visto este trabajo con hongos ostra. Y funciona mejor cuando los hongos que se usan son muy jóvenes. Ellos no deberían estar todavía totalmente formados, sólo de unos 3 a 5 cm de alto. En esta fase, el tejido del hongo está creciendo rápidamente. Si los hongos jóvenes son cortados y echados en algo de paja preparada, ellos harán micelio en solo un par de días. Aquí está lo que hará:

- 3 Prepare un lote de paja por el método de la imbibición en peróxido a temperatura ambiente, presentado más adelante en este volumen.
- 4 Escoja un racimo joven de hongos ostra.
- 5 Introduzca el racimo brevemente en agua jabonosa templada para limpiarlo, luego sacúda el líquido.
- 6 Coloque el racimo sobre un pedazo nuevo de papel de cera o alguna otra superficie limpia.
- 7 Usando un cuchillo limpio, corte los hongos en pedazos (el tamaño exacto no importa). Sostenga el racimo por la base. Trate de no tocar los hongos con sus manos desnudas.
- 8 Ponga los pedazos de hongo en su paja preparada. Manipule la paja con guantes descartables de manera de distribuir y mezclar bien los pedazos.
- 9 Incube la paja como usted lo haría con un cultivo ordinario.

Notas sobre el protocolo:

2) No tengo una fórmula precisa para la cantidad de tejido de hongo a usar. Esto dependerá de cuán finamente usted corte el tejido. Pero puede empezar con aproximadamente un 15% de pedazos de hongo en relación al peso del substrato seco.

3) Este baño jabonoso previene el traslado de ácaros y otros insectos durante la inoculación. Probablemente también reduce la contaminación por bacterias y moho.

5)-6) También se puede usar un procesador de comida para cortar finamente sus cuerpos de fructificación, y ésta probablemente es una buena idea si hay alguna oportunidad de que sus cuerpos de fructificación contengan larvas de la mosquita del hongo. Simplemente limpie muy bien el recipiente y la cuchilla del procesador de comida con agua jabonosa caliente antes del uso. Yo especialmente no recomiendo crear un puré de tejido del hongo--el agua extra en el puré tendrá que ser drenada de su paja después de la inoculación.

El problema de la senescencia

¿Llevará la repetición de este método a la senescencia (deterioro relacionado con la edad) del cultivo de hongo? Favorezco la idea que la mayoría de lo que es llamado senescencia por los cultivadores de hongo realmente está causada por prácticas del cultivo inadecuadas. Está claro que los cultivos de hongos pueden transferirse durante años en medio de calidad. Debería simplemente mantenerse deficiente para prevenir la acumulación de metabolitos tóxicos. También debería cocinarse sólo ligeramente para prevenir la caramelization de azúcares.

Aunque no puedo descartarla, pienso que no es probable que la senescencia sea un problema al menos durante varios años. Algunos de los organismos más grandes en la tierra son hongos únicos que cubren vastas regiones de tierra; estos organismos

deben de haber tardado muchos años para alcanzar su tamaño actual. Así que es bastante posible que aún cuando los hongos envejezcan, la duración de su vida sea similar a la del humano, si es que no es más prolongado.

Preparación de Substrato en Masa

Substrato en masa I: Preparando paja con peróxido a temperatura ambiente

El siguiente es un método para usar peróxido para preparar paja para usarla como substrato para hongos. Este método debería ser atractivo tanto para el cultivador en el hogar como para el productor comercial. El procedimiento puede llevarse a cabo completamente a temperatura ambiente, sin los pasos de calentar y enfriar, y no requiere ninguna solución cáustica. Esto hace que la preparación del substrato sea muy fácil y conveniente. No hay necesidad de preparar dispositivos para calentar grandes cantidades de agua o de substrato. Tampoco hay problemas de sobrepasteurización, ni preocupación por la velocidad de enfriamiento. Y no hay ningún residuo problemático originado por el proceso de preparación del substrato. Sólo hay un "té" o jugo natural que se produce normalmente al empapar la paja en agua.

El procedimiento se diseñó para paja, pero también debería ser posible preparar de esta manera a otros substratos "drenables". Éstos incluirían materiales como el bagazo, céspedes secos, y hojas secas de maíz. Materiales de este tipo son fácilmente disponibles en casi todo mundo. También me han dicho que las cáscaras de la semilla del algodón pueden prepararse de esta manera. Así otras cáscaras no-porosas de frutos tipo nuez también pueden funcionar. (Las virutas de madera se preparan mejor por un procedimiento ligeramente diferente--vea debajo).

Yo he probado el protocolo con la ostra del olmo (H. Ulmarius) y con el hongo almendra (Agaricus subrufescens). Especies similares como el ostra tradicional (especies de Pleurotus), los Portobellos, los hongos blancos champignon, y el Agaricus Sol Real (Agaricus blazei) deberían crecer bien sobre la paja preparada de esta manera. Más que un signo de interrogación es el shiitake. Se cultiva típicamente en paja con un suplemento de nitrógeno, y yo no he usado un suplemento para cultivar la ostra del olmo y el hongo almendra .

¿Qué sobre las enzimas?

Aquí debo admitir que previamente argumenté que la pasteurización de la paja con peróxido no serviría. Razoné que la paja contiene altos niveles de enzimas que descomponen peróxido (como ocurre en otros substratos similares). Estas enzimas deberían destruir el peróxido a corto plazo. Ellas también protegerían del ataque del peróxido a las numerosas esporas de moho presentes en la paja. Pero no obstante resulta que la paja PUEDE pasteurizarse con peróxido de hidrógeno. De hecho las enzimas presentes en la paja destruyen el peróxido en un tiempo relativamente corto. Pero aún así el peróxido puede igualmente tener un efecto beneficioso durante el breve tiempo que sobrevive en contacto con la paja. Sólomente tenemos que elevar la concentración del peróxido (comparable a la que previamente empleé para la preparación de pellet combustible). Y nosotros tenemos que modificar ligeramente la química de la solución del peróxido. El propio peróxido no subsiste para proteger la

paja de la contaminación, como lo hace en un sustrato de pellet combustible libre de enzimas. Pero la paja tratada con peróxido parece resistir la contaminación, aún después que el peróxido se ha ido. Y parece convertirlo en un sustrato más favorable para el crecimiento del micelio de hongo.

El protocolo

A pesar de este prólogo complicado, el protocolo para preparar paja con peróxido es sumamente simple. Es así:

- 1) Coloque su paja en un contenedor grande para remojo.
- 2) Llene el contenedor con la solución fría apropiada (vea debajo) para sumergir la paja.
- 3) Para la paja picada, remoje aproximadamente 4 horas a temperatura ambiente. Para la paja no picada, remoje por lo menos por 28 horas, o hasta que el lixiviado tome el color de un buen té.
- 4) Drene la paja completamente, hasta que no gotee más.
- 5) Coloque la paja en sus contenedores de cultivo, mezclando el blanco de hongo a medida que lo hace.

Notas sobre la preparación de la paja (relativas a los números de los pasos):

1) Si el recipiente de remojo tiene una tapa pesada o con buen cierre, esto puede ayudar a mantener la paja sumergida en la solución.

2) La solución más efectiva de peróxido de hidrógeno que he encontrado hasta ahora es a una concentración de por lo menos 0,15%. Esto se combina con 10 ml de vinagre por cada litro de solución de inmersión, o aproximadamente 2,5 cucharas de vinagre por cada 3,5 litros. En mini-ensayos, no funcionaron concentraciones más altas de vinagre.

Curiosamente, una alternativa que en los mini-ensayos probó ser casi igualmente eficaz es usar peróxido con cal hidratada (hidroxido del calcio, la cal de albañiles). Pero aquí usted usará mucho menos cal hidratada que la que se usó para la inmersión en cal hidratada detallada en el Volumen I. Aquel protocolo usa tanta cal hidratada que crea problemas de disposición del lixiviado cuando usted dreña la paja. En cambio ahora simplemente agregará suficiente cal hidratada para levantar un poco el pH mientras el peróxido reacciona con la paja. Usted usará simplemente 1/2-2/3 cucharadas de cal hidratada por cada 3,5 litros de solución del peróxido 0,15%, o 0,4 – 0,5 g por litro de solución. Concentraciones más altas de cal hidratada no funcionaron en los mini-ensayos.

Recomiendo la alternativa de la cal hidratada sobre todo para materiales que son naturalmente ácidos. Por ejemplo, las cáscaras de la semillas del algodón pueden prepararse de esta manera, pero no con la alternativa del vinagre (Michael Joy, comunicación personal).

Cierta clase de cal hidratada disponible comercialmente se hace de dolomita. Esta contiene magnesio, que no se recomienda para los hongos. Así que si es posible evite las cales dolomíticas. Sin embargo, el procedimiento de la inmersión de la paja, igual funcionará con cal hidratada dolomítica.

Aquí está cómo calcular cuánta solución de peróxido stock usted necesitará:

Su solución de inmersión necesita alcanzar una concentración de 0,15%. Así que primero divida 0,15% por la concentración de su solución stock de peróxido. Entonces multiplique la respuesta por el volumen de agua que usted usará. Por ejemplo, digamos que usted quiere hacer 100 litros de peróxido 0,15%, y su solución stock de peróxido es 6%. Entonces 0,15 dividido por 6 le dan 0,025. Multiplicando esto por 100 litros le da 2,5 litros. Ésa es la cantidad de peróxido 6% que usted necesitará agregar a 100 litros de agua para conseguir una solución 0.15%. (Para ser más preciso, usted realmente debe agregar 2.5 litros a 97.5 litros de agua. Eso le da un volumen total de 100 litros. Pero cualquiera sea el modo en que lo haga, está bastante cerca).

Las soluciones pueden prepararse con agua fría de la canilla. Pero lo más seguro es usar agua a una temperatura cercana a la ambiental.

3) Mi consejo es cortar la paja para obtener mejores resultados. El cortado de la paja promueve una absorción de agua más eficiente. El tamaño más pequeño de las partículas también estimula un crecimiento micelial más rápido después de la inoculación.

La imbibición de la paja ocurrirá más rápidamente en climas más calurosos, más despacio en los más fríos. Ajuste su tiempo de imbibición de acuerdo con ello.

4) Cuánto tiempo usted tiene que drenar la paja depende con cuánta paja está trabajando. Pero probablemente como mínimo serán un par de horas.

5) La paja puede mezclarse con blanco de hongo y, por ejemplo puede cargarse en forma de columnas en bolsas plásticas. Si se agregara yeso pasteurizado, también puede mezclarse en esta fase.

No recomiendo agregar suplementos de nitrógeno porque la mayoría de ellos, como el salvado, invitarán a los contaminantes. Pero si usted debe usar un suplemento, yo sugeriría el uso de materiales drenables similares a la paja. Uno de tales materials es la alfalfa que puede empaparse en la solución de peróxido con la paja.

Sustrato en Masa II

Preparando viruta de madera con peróxido

Algunas especies de hongos se han sido cultivado tradicionalmente a campo en camas de virutas. Las virutas usualmente se preparan simplemente regando durante varios días hasta que estén húmedas. Sin embargo, los cultivadores han notado que a menudo aparecen especies de malezas. También, las especies inoculadas pueden terminar fructificando lejos de la cama. Así que se requiere de una manera más limpia de preparar las virutas.

Yo encuentro que las virutas de madera cruda pueden prepararse con peróxido, a pesar de su contenido de enzimas que descomponen el peróxido. Pero el procedimiento que funciona para la paja resulta en virutas de madera que son bastante lentas en colonizar. Para mejores resultados, recomiendo un método diferente:

- 1) Sumerja las virutas en agua toda la noche para húmedecerlas.
- 2) Drene.

- 3) Cubra las virutas con peróxido a una concentración de 1% o más alta.
 5 Inocule con blanco de hongo hecho con aserrín.

Las virutas pueden cubrirse con peróxido en forma de una fina llovizna o rocío mientras está mezclando. Aunque la concentración del peróxido es alta, de esta manera se usa una cantidad relativamente pequeña de peróxido.

Las virutas pueden inocularse inmediatamente si su blanco de hongo creció en presencia de peróxido. Sin embargo, usted puede dejar pasar algún tiempo para que se degrade el peróxido a medida que reacciona con las enzimas en las virutas.

También se puede agregar a las virutas un suplemento de nitrógeno como Sylvan's CG60 con tal de que al suplemento se le de el mismo tratamiento que a las virutas. Yo todavía no he probado otros suplementos.

Este procedimiento trabaja bien para el hongo ostra del olmo. También debe funcionar para el Rey Stropharia (*Stropharia rugosa-annulata*), el cual los cultivadores domésticos a menudo han intentado cultivar en virutas preparadas simplemente con agua. Pero recuerde que después de la colonización de las virutas, *Stropharia* necesita una capa de tierra de cubierta aplicada encima de las virutas para que la fructificación pueda ocurrir.

Substrato en Masa III:

Un método de "agregar-y-agitar" para substratos compatibles con peróxido

El siguiente procedimiento le permite preparar substrato para hongo basado en madera a temperatura ambiente, virtualmente en un solo paso. Al contrario de los métodos anteriores para paja y virutas de madera, este procedimiento REQUIERE que usted use un material de partida esencialmente desprovisto de enzimas que descomponen peróxido. El peróxido agregado permanecerá en el substrato y lo protegerá contra los contaminantes del aire. De manera que no habría necesidad de usar medios estériles o filtración de aire. Los substratos resultantes deberían permitir el crecimiento sin contaminantes de cualquier especie de hongo que descomponga la madera. Por supuesto, Ud. necesitará hacer una elección apropiada del tipo de madera, aditivos y condiciones de cultivo.

En el primer volumen de *Cultivando Hongos de Manera Fácil*, presenté un procedimiento para preparar pellet de madera combustible. Ese procedimiento requería como primer paso el agregado de agua hirviente a los pellets. Esto servía a dos propósitos, pasteurizar los pellets y desagregarlos rápidamente en el aserrín. La solución del peróxido sólo entraba en escena después de que los pellets se habían enfriado. Entonces servía para matar las esporas resistentes al calor presentes en el substrato y protegerlo de contaminantes del aire. Este procedimiento es suficientemente fácil para el cultivador doméstico. Pero su requisito de dos pasos en que se agrega líquido, así como el calentamiento y enfriado, lo hace más bien complicado para utilizarlo a una escala de producción comercial. También, la pasteurización con agua hirviente no trabaja bien con aserrín secado al horno.

El nuevo procedimiento evita la complicación del procedimiento anterior usando diez veces más peróxido. A este nivel, la propia solución del peróxido pasteuriza el substrato, y lo hace a temperatura ambiente. Eso significa que no hay necesidad de

calentar y enfriar. También implica que puede agregar el peróxido con toda el agua en un solo paso. Y lo que es más, usted puede agregar todos sus otros aditivos junto con la solución del peróxido: cal, yeso, y los suplementos de nitrógeno compatible con peróxido. Eso le proporciona lo que esencialmente es un método de "agregar y revolver" para hacer un sustrato de hongo listo para usar. Realmente no es tan fácil como hacer panqueques con una mezcla--usted necesitará esperar que el peróxido pasteurice el sustrato. Pero hasta ahora, es indudablemente uno de los métodos más simples inventado de preparar sustrato de aserrín.

Como sustrato base, usted puede usar cualquier producto de madera compatible con peróxido. Usted puede usar pellet de madera combustible, aserrín secado al horno, leños compuestos (formados de diferente tipo de madera), cama de gato a base de aserrín, y pellets de fibra de papel. Yo incluso he tenido éxito usando pellet de paja preparado de esta manera para el crecimiento de los ostras del olmo, a pesar de la presencia en la paja de un nivel bajo de enzimas que descomponen peróxido. Simplemente esté seguro que el material que usted escoge es de alguna forma apropiado para el crecimiento de las especies de hongos que usted quiere cultivar.

Una palabra sobre el aserrín secado al horno. En mi área del Noroeste del Pacífico, éste es el tipo de aserrín de madera dura más comúnmente disponible. Es el tipo de aserrín que viene de la molienda de madera aserrada secada al horno. Usted lo encontrará en los molinos y en los comercios que producen productos de madera con valor agregado como pisos de maderas, tableros, mobiliario, y otros. Por contraste, el aserrín crudo viene de la molienda de troncos. El aserrín secado al horno tiene cantidades muy pequeñas de enzimas capaces de descomponer peróxido. Hay tan poca cantidad que las enzimas son difíciles de detectar, pero es suficiente para que el peróxido se haya eliminado en un par de días. Este nivel de actividad enzimática hace que el aserrín sea apropiado para cultivar los hongos ostra por el método de "agregar-y-agitar". Los hongos ostra crecen rápidamente y son relativamente resistentes a los contaminantes. Pero otras especies como el shiitake y melena de león, que son de crecimiento más lento o son más sensibles a la contaminación, tienen menos probabilidades de tener éxito en sustrato de aserrín secado al horno.

¿Cómo puede saber si una muestra de aserrín es realmente secada al horno? Deje caer un poco en una cantidad pequeña de solución de peróxido 3%, y agregue una gota de detergente. Si no hay más que un débil y pequeño siseo producido después de aproximadamente diez minutos, su muestra fue secada al horno, debe funcionar como un material de arranque para cultivar los hongos ostra con el protocolo de "agregar-y-agitar."

El material secado al horno puede ser demasiado "esponjoso" para pasteurizar con una cantidad limitada de agua hirviente, como se hace en mi procedimiento previo para pellet combustible del Volumen I. Pero es razonablemente fácil cubrir el aserrín uniformemente con solución de peróxido para pasteurizar, como se hace en el nuevo procedimiento de "agregar-y-agitar" que describo a continuación.

El protocolo de "agregar-y-agitar"

Aquí está el nuevo protocolo aplicado para preparar pellet combustible a la temperatura ambiente. El aserrín secado al horno puede prepararse esencialmente de la misma manera, pero absorberá más agua, y ocupará más espacio en su recipiente:

- 1) Limpie y enjuague un recipiente (no se requiere un enjuague con agua hirviente).
- 2) Mida su cal, suplemento de nitrógeno compatible con peróxido, y yeso si fuera a ser usado. Téngalos al alcance de la mano (vea el Volumen I para determinar las cantidades apropiadas).
- 3) Mida su pellet combustible adentro del recipiente.
- 4) Mida en un recipiente separado aproximadamente 6,2 litros de agua para cada 4,5 kg de pellet combustible (pero vea la nota debajo). El agua necesita estar por lo menos a "temperatura ambiente" (20 °C) o estar ligeramente tibia al tacto. Esto ayuda a desagregar los pellets hechos de maderas densas como los de roble. Como en protocolos anteriores, el agua también necesita estar libre del particulados visibles.
- 5) Agregue peróxido al agua para alcanzar una concentración de aproximadamente 0,45%.
- 6) Algunos tipos de pellet combustible, como el hecho de roble, no se desagregan fácilmente en agua. Para éstos, agregue también una cucharilla (5ml) de polvo de hornear cada 6,2 litros de solución de peróxido.
- 7) Después de revolver el polvo de hornear en la solución del peróxido, vierta la solución en el pellet combustible. Luego agregue los otros ingredientes secos. Hágalo en este orden para que los otros ingredientes secos no se peguen en el fondo del recipiente.
- 8) Cierre la tapa y permita que los pellets absorban la mayor parte del agua (esto puede tomar 10-15 minutos).
- 9) Mezcle el sustrato completamente rodando el recipiente.
- 10) Permita que el sustrato se asiente en el recipiente cerrado durante por lo menos 2 horas.
- 11) Mezcle el sustrato completamente de nuevo. Por este tiempo, el sustrato debería estar por lo menos la mitad en forma de aserrín y la mitad como remanentes redondos de pellets.
- 12) inocule el sustrato y divida en bolsas.

Notas sobre el protocolo de "agregar-y-agitar":

Como siempre, es mejor usar maderas apreciadas por la especie de hongo que usted quiere cultivar. En general, evite las maderas resinosas como las del cedro y pino.

En el Volumen I, sugerí como suplementos de nitrógeno varios materiales procesados sin enzima. En general, éstos son caros o difíciles de encontrar. Pero ahora he descubierto que es posible usar algunos materiales "naturales" más comunes --por lo menos para el cultivo del ostra del olmo y del Melena de León por el método de "Agregar-y-agitar". Uno de los materiales son avenas cortadas al acero. Ellas contienen aproximadamente 2,5% nitrógeno. (El trigo roto también debería servir. Contiene aproximadamente 2% nitrógeno.) Aunque hay enzimas que descomponen el peróxido en las partículas de la avena, en los mini-ensayos con los hongos ostra ellas no han causado que el sustrato se estropee. Lamentablemente, los mini-ensayos con el Melena de León no fueron exitosos.

Hay también una manera simple de aumentar la efectividad de estos suplementos: cúbralos con una pequeña cantidad de aceite vegetal. El micelio de hongo consume ávidamente el aceite.

Usted probablemente tendrá que experimentar un poco para encontrar la cantidad correcta de agua a agregar. Esto varía con el tipo de material que usted use como sustrato, y con el tipo de madera. Para el aserrín, usted puede usar un peso igual de agua. Para los pellets de madera, esto puede ser demasiado. Usted debe agregar suficiente agua para desagregar los pellets de madera a partículas. Pero el material que queda en el fondo del recipiente (cuando usted vuelca el sustrato dentro de las bolsas) podría no estar visiblemente humedecido. Los pellets hechos de las maderas más livianas probablemente absorberán más agua por peso de pellets que aquéllos hechos de maderas más densas.

Algunos materiales sustrato, como el aserrín secado en horno, puede resistirse al mojado. En esta situación, usted puede agregar una cantidad pequeña de detergente biodegradable para vajilla para acelerar la absorción del agua. Por ejemplo, he usado 2,5 ml por 6,2 litros.

La alta concentración de peróxido usada en este protocolo se logra fácilmente con una solución de peróxido stock que está más concentrada que el producto usual de farmacia. Yo he usado 1/3 taza (aproximadamente 80 ml) de peróxido de piscina de natación para aproximadamente 6,2 litros de agua. Este producto estaba etiquetado como 27%, pero realmente probó ser 34% por descomposición. Usted también podría usar el de calidad de alimento (35%) o soluciones similares. Recuerde que estos productos concentrados son mucho más peligrosos que la solución 3%. El líquido puede causar quemaduras, fuegos, o explosiones, así que debería tratarse con mucho respeto. Lea la etiqueta de la advertencia y actúe de acuerdo con ella.

¿Cuánta solución de peróxido stock necesitará usted? Su solución final debe alcanzar una concentración de 0,45%. Así que primero divida 0,45% por la concentración de su solución stock. Luego multiplique el resultado por el volumen de agua que usted usará. Por ejemplo, digamos que usted quiere hacer 20 litros de peróxido 0,45% desde una solución stock que es 6% en peróxido. Entonces 0,45 dividido por 6 le da 0,075. Multiplicando por 20 litros le da 1.5 litros. Ésta es la cantidad de peróxido 6% que usted necesitará agregar a 20 litros de agua para conseguir una solución 0,45%. (Realmente, usted agregaría 1,5 litros a 18,5 litros de agua para conseguir una solución exactamente 0.45%. Pero del otro modo estará suficientemente cerca.)

El sustrato puede mezclarse la primera vez con instrumentos no pasteurizados, si esto es más conveniente que hacer rodar el recipiente. Sin embargo, después de este primer mezclado, los instrumentos no-pasteurizados deberían mantenerse lejos del sustrato. Sólo deberían usarse instrumentos pasteurizados (es decir enjuagados con agua en ebullición).

¿Qué hay acerca de hacer blanco de hongo con el método de "agregar-y-agitar"? Yo he tenido éxito al hacer esto con mis hongos ostra del olmo. Los cultivos inoculados con él en momentos parecían cuestionables, pero ellos completaron su colonización y formaron hongos. Para darle a esto una oportunidad, simplemente prepare algún medio tal como el anterior para el blanco de hongo de ocho minutos, pero aumente la concentración del peróxido a 0,45%. Si usted está usando frascos, moje los discos de cartón dentro de las tapas with peróxido 3%. Luego permita que el blanco de hongo se asiente, cerrado en su recipiente, durante por lo menos dos horas antes de inocular.

Conclusión

Los procedimientos que he detallado en este suplemento dan un vislumbre de la tremenda variedad posible en las técnicas para el cultivo de los hongos. En cualquier momento, usualmente tengo por lo menos unas pocas ideas para nuevos trucos que no he tenido oportunidad de probar. Y sé por la correspondencia que recibo, que muchos de mis lectores tienen también sus propias ideas fascinantes. Yo espero que este volumen estimule una mayor creatividad en este campo en rápida expansión.

Sobre el Autor

Rush Wayne posee un grado de Magister en Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Harvard y un Ph.D. en Bioquímica de la Universidad de California en Berkeley. Él se expuso por primera vez a los fundamentos del cultivo de hongos durante su trabajo de graduado en los 1970's pero recién comenzó a cultivar hongos formalmente cuando empezó a llevar a cabo las innovaciones contenidas en este manual, en 1993. Las instrucciones para su método del peróxido para el cultivo de hongos están ahora en manos de cultivadores de hongos en más de 65 países alrededor del mundo.

Sobre el Traductor

Néstor Curvetto es Investigador Principal del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas y Profesor Titular en el Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur (UNS) de la República Argentina. Es Magister en Ciencias Agrarias de la Universidad de Guelph (1979, Canadá) y Doctor en Bioquímica (1986, UNS, Argentina). Su área de investigación y docencia es la fisiología y el cultivo de tejidos en plantas pero desde principios de los 90 se interesó también en la biotecnología de hongos comestibles y medicinales con énfasis en especies de *Pleurotus*, *Lentinula* y *Ganoderma* y ha organizado cursos de posgrado con la participación de expertos de Nueva Zelanda y Canadá. Tiene un gran interés en la divulgación de diferentes métodos de producción de hongos para su incorporación al sistema productivo intensivo de los países emergentes.