

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SEDE RODRIGO FACIO
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA DE INGENIERÍA DE BIOSISTEMAS

PROYECTO DE GRADUACIÓN

ELABORACIÓN DE UN MATERIAL BIOLÓGICO A PARTIR DEL HONGO
PLEUROTUS OSTREATUS PARA SU UTILIZACIÓN EN APLICACIONES DE
INGENIERÍA.

Trabajo final de graduación para optar por el grado de Licenciatura en
Ingeniería Agrícola y de Biosistemas

Fabián David Jiménez Rey

Noviembre, 2018

“Elaboración de un material biológico a partir del hongo *Pleurotus ostreatus* para su utilización en aplicaciones de ingeniería”

Trabajo Final de Graduación sometido a revisión por la Comisión de Trabajos Finales de Graduación de la Escuela de Ingeniería de Biosistemas de la Universidad de Costa Rica, como requisito para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Agrícola.

Fabián David Jiménez Rey

Candidato

Carlos Rojas Alvarado, Ph.D.
Director de Tesis

Karina Rodríguez Mora, M.Sc.
Miembro Comité Asesor

Ronald Aguilar Álvarez, Ph.D.
Miembro Comité Asesor

Marta Montero Calderón, Ph.D.
Presidenta Tribunal Examinador

Beatriz Mazón Villegas, Ph.D.

Miembro Lector del Tribunal Examinador

DEDICATORIA

A Dios por ser guía de mis metas, que me ha dado la fortaleza y la perseverancia para llevar a cabo el desarrollo de este proyecto de tesis.

A mis padres Wilberth y Ginette por el apoyo brindado a lo largo de toda mi vida universitaria y por ser piezas de vital importancia para la conclusión de mis estudios, guías en mi formación como persona.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos Rojas Alvarado por su apoyo como director a lo largo del desarrollo de esta tesis. Por su importante aporte en mi vida profesional y académica.

A los lectores M.Sc. Karina Rodríguez y Dr. Ronald Aguilar por su cooperación y observaciones que permitieron hacer de esta tesis un documento con alto valor científico.

A la Licda. Milagro Mata por ser pieza importante en la transmisión del conocimiento necesario a lo largo del desarrollo de la presente tesis. Por su interés y cooperación incondicional.

A la Unidad de Recursos Forestales, por brindarme el apoyo con materiales y equipos de laboratorio.

A Steffany Orozco Cayasso del Laboratorio de Fitopatología de la Escuela de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional por el préstamo del laboratorio y los equipos para la realización de la investigación.

A Juan Pablo Castillo Jiménez del Laboratorio de Entomología de la Escuela de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional por el préstamo del laboratorio y equipo para la realización de la investigación.

Al Sr. Pedro Rojas, por la cooperación brindada durante el proceso investigativo.

A la Licda. Paula Sanabria Hernández de la Biblioteca Especializada de Ciencias de la Tierra y el Mar de la Universidad Nacional por su cooperación en la estructuración y formato del trabajo escrito.

Al Sr. Félix Gómez Castillo del Área de fertilidad de suelos y nutrición del Centro de Investigaciones Agronómicas por el préstamo del laboratorio y equipos para el secado y molienda de los sustratos.

A Sr. Francisco Villalobos, jefe del departamento de estructuras del LANAMME por la cooperación con las pruebas físico-mecánicas realizadas al material.

RESUMEN

En este trabajo se documentó la fabricación de un material biológico elaborado a base del hongo *Pleurotus ostreatus* y residuos agroforestales para su utilización en aplicaciones de ingeniería. Tras el proceso de investigación, se logró diseñar un procedimiento para la creación del mismo. Para lo anterior, previo a la fabricación del material, se realizaron una serie de pruebas físico-mecánicas con el fin de evaluar su aptitud como reemplazo de materiales comunes y se hicieron comparaciones con el poliestireno expandido para contextualizar el material en términos de sostenibilidad. Durante las pruebas preliminares de crecimiento, los sustratos utilizados comprendieron residuos agrícolas como el bagazo de caña (*Saccharum officinarum*), el pasto de arroz y granza de arroz (*Oriza sativa*) y el raquis de banano (*Musa sp.*). De forma similar se utilizaron residuos de aserrío de maderas como pino chileno (*Pinus radiata*), guapinol (*Hymenaea courbaril*), teca (*Tectona grandis*), roble coral (*Terminalia amazonia*) y guanacaste blanco (*Enterolobium schomburkii*), disponibles en el laboratorio de la Unidad de Recursos Forestales del Instituto de Investigaciones en Ingeniería (INII). El fin de estas pruebas preliminares consistió en escoger dos sustratos sobre los cuales llevar a cabo las pruebas finales. Los resultados obtenidos durante dichas pruebas preliminares mostraron que el crecimiento micelial (rapidez y uniformidad de colonización como también consistencia al tacto) fue deficiente en sustratos como la teca, el roble coral y el Guanacaste blanco, mientras que en sustratos como el pino el crecimiento micelial fue moderado. Por otro lado, en sustratos como la granza de arroz y el raquis de banano el crecimiento fue nulo por problemas de contaminación. Finalmente, en sustratos como el pasto de arroz, el bagazo y el aserrín de guapinol, el crecimiento micelial fue adecuado. Con base en estos resultados y debido a su disponibilidad y fácil obtención, se escogieron los primeros dos sustratos para conducir los ensayos finales. En esta segunda etapa de ensayos, la siembra del hongo en los sustratos seleccionados se llevó a cabo utilizando tres mezclas diferentes, cada una con ocho réplicas y por medio de la utilización de moldes duros. Las mejores condiciones de incubación encontradas en la fase preliminar fueron usadas y para la creación del material, una malla estructural fue utilizada. Lo anterior con el objetivo de ofrecerle al material una resistencia

estructural adecuada en un periodo de incubación corto. Tras un mes de incubación, las matrices hongo-sustrato generadas se deshidrataron para luego someter las muestras a ensayos de flexión (norma ASTM C203-05) y densidad (norma ASTM C303-10). Los resultados mostraron diferencias significativas en la densidad de los materiales elaborados, siendo mayor la densidad de las muestras experimentales de pasto de arroz fino con pasto de arroz grueso con valores de 132.7 kg/m^3 . Por otro lado, existieron diferencias significativas en el esfuerzo de flexión, siendo mayor este parámetro en este caso para las muestras experimentales de bagazo fino con pasto de arroz grueso con valores de 0.08 MPa. Finalmente se determinó el módulo de elasticidad de ambos tipos de muestras experimentales, encontrándose que no existen diferencias significativas en este parámetro y reportándose valores promedio de 1.43 MPa.

El material creado, con el procedimiento diseñado en este trabajo, resultó ser potencial reemplazo del poliestireno expandido en ciertas aplicaciones como aislamiento térmico, material de embalaje, vajillas desechables, entre otras. Más allá de eso, su alto valor en términos de sostenibilidad, al ser esencialmente una reconversión de desechos agroindustriales, lo convierte en una estrategia moderna de aplicación ingenieril al servicio de la sociedad.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE CUADROS	VIII
1.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN	9
1.1.1 OBJETIVOS	9
1.2 HONGOS Y SUS USOS	10
1.2.1 HONGO <i>Pleurotus ostreatus</i>	10
1.2.2 CLASIFICACIÓN	12
1.2.3 APLICACIONES DE LOS HONGOS EN LA INGENIERÍA	13
1.3 LOS MATERIALES BIOLÓGICOS	14
1.3.1 GENERALIDADES DE LOS MATERIALES BIOLÓGICOS	14
1.3.3 APLICACIÓN DE MATERIALES BIOLÓGICOS EN LA INGENIERÍA	19
1.4 LOS MATERIALES UTILIZADOS MÁS COMUNES Y SU HISTORIA	20
1.5 LA MATRÍZ DE RESIDUOS ORGÁNICOS EN COSTA RICA	24
1.6 CARACTERÍSTICAS DE LOS SUSTRATOS Y GRANULOMETRÍAS	26
1.7 PROCEDIMIENTO DE MANEJO Y PRODUCCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO	28
1.8 HIPÓTESIS DE TRABAJO	29
CAPÍTULO 2. ARTÍCULO CIENTÍFICO	31
CAPÍTULO 3. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	59
ANEXOS	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Elaboración de un material biológico a partir del hongo *Pleurotus ostreatus* para su utilización en aplicaciones de ingeniería

Figura 1. Componentes comunes de la pared celular del hongo	11
Figura 2. Caracterización de los materiales biológicos	16
Figura 3. Factores que influyen en la elaboración del material biológico	18
Figura 4. Diagrama de flujo del proceso llevado a cabo para la elaboración del material biológico.	29

“¿Es posible crear un material biológico para aplicaciones ingenieriles utilizando el hongo *Pleurotus ostreatus*?: Un estudio de caso”

Figura 1. Muestra visual del bloque de material preparado en este estudio mostrando sus dimensiones. A) Vista superior B) Vista lateral	39
Figura 2. Apariencia visual de los tres tipos de bloque preparados en el estudio	41
Figura 3. Diagrama de método utilizado para las pruebas de flexión.....	42
Figura 4. Diferencias visuales en el crecimiento micelial entre muestras desarrolladas.	48

ÍNDICE DE CUADROS

Elaboración de un material biológico a partir del hongo *Pleurotus ostreatus* para su utilización en aplicaciones de ingeniería

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i>	10
Cuadro 2. Indicadores de desempeño en la producción cementera mundial	23
Cuadro 3. Estimaciones de biomasa húmeda, seca y energía primaria por tipo específico de RAO en Costa Rica.....	24
Cuadro 4. Total de fincas con actividad agrícola por principal tipo de tratamiento de residuos según provincia.....	26

“¿Es posible crear un material biológico para aplicaciones ingenieriles utilizando el hongo *Pleurotus ostreatus*?: Un estudio de caso”

Cuadro 1. Valores promedio asociados con las variables registradas para medir densidad del material en el estudio presente.	50
Cuadro 2. Valores promedio asociados con las variables registradas para medir flexión del material en el estudio presente.....	51

CAPÍTULO 1. CONTEXTO ACTUAL DE LA INVESTIGACIÓN

1.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

Los hongos son organismos vivos que se encuentran distribuidos ampliamente en el planeta y llevan a cabo miles de funciones en los ecosistemas. En zonas tropicales como Costa Rica, los hongos no solamente son abundantes sino diversos, y representan productos forestales no maderables con potencial de uso muy grande, que ha sido pobremente explotado desde la perspectiva de la ingeniería. En este sentido, la evidencia bibliográfica sobre la utilización de hongos para aplicaciones con potencial de resolver problemáticas particulares es limitada.

El avance en tecnologías continúa imponiendo requerimientos para los materiales utilizados en la ingeniería. Por ello es necesario que la investigación sobre materiales siga llevándose a cabo. Por ejemplo, el mejoramiento del desempeño mecánico de los mismos y la producción bajo estándares responsables con el ambiente y energéticamente eficientes (1) son imperativos en este momento. Por lo anterior, el hecho de investigar el desarrollo de un material biológico a partir de hongos para su utilización en aplicaciones de ingeniería no es un tema trivial y conlleva un alto grado de originalidad. Algunas de estas aplicaciones pueden contemplar su uso en materiales de embalaje, aislamiento térmico, vajillas desechables y como formaleas en el sector construcción, entre otros.

1.1.1 OBJETIVOS

Objetivo General:

Caracterizar la elaboración de un material biológico producido con el hongo *Pleurotus ostreatus* como alternativa sostenible para su utilización en aplicaciones de ingeniería.

Objetivos específicos:

1. Diseñar un procedimiento para la creación de un material biológico elaborado con el hongo *Pleurotus ostreatus* para su uso en aplicaciones ingenieriles.
2. Evaluar el uso de distintas mezclas de sustratos base y granulometrías en la elaboración biológica del material.
3. Identificar los beneficios asociados con la utilización del material biológico en comparación con el uso de materiales comunes en un contexto de sostenibilidad.

1.2 HONGOS Y SUS USOS

1.2.1 HONGO *Pleurotus ostreatus*

El hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*) es un hongo comestible, saprófito descomponedor primario. Su clasificación biológica (Cuadro 1), incluye a este hongo dentro del grupo de los Basidiomycota, comúnmente conocidos como setas.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del hongo *Pleurotus ostreatus*

<i>Pleurotus ostreatus</i>	
Reino	Fungi
Filo	Basidiomycota
Clase	Homobasidiomycetes
Subclase	Hymenomycetidae
Orden	Agaricales
Familia	Pleurotaceae
Género	Pleurotus
Especie	ostreatus

Fuente: (16)

La pared celular de esta especie de hongo, como la de cualquier otro, desempeña varias funciones morfológicas, protegiendo las hifas y proporcionando la resistencia mecánica a todo el micelio (18, ver Figura 1). Está compuesta por quitina, glucanos y una capa externa

de proteínas, tales como manoproteínas e hidrofobinas. El crecimiento de las hifas se lleva a cabo por medio de la extensión de la pared de las esporas, en la cual se restringe la síntesis de la pared celular al ápice hifal (18).

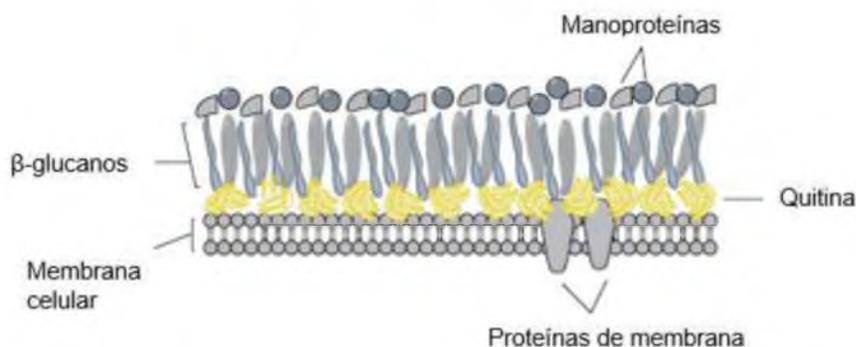


Figura 1. Componentes comunes de la pared celular del hongo

Fuente: (17)

La temperatura óptima de incubación ronda entre los 25°C y los 28°C, siendo su crecimiento más acelerado según se acerque esta temperatura al rango superior. Las condiciones de luz para el crecimiento del micelio son nulas, sin embargo si se desea permitir que el hongo produzca cuerpos fructíferos, se requiere de una intensidad lumínica de entre 50 y 500 lux por 12 horas diarias, humedad relativa óptima de aproximadamente el 80% (19) y concentraciones altas de CO₂ (20).

A diferencia de materiales desarrollados a partir de otras especies de hongos como *Ganoderma lucidum* que presentan mayor contenido proteico y lipídico (plastificantes naturales), el material resultante de la interacción del hongo *Pleurotus ostreatus* con diversos sustratos, parece ser más rígido debido a la mayor presencia de polisacáridos. Lo anterior permite que estos materiales sean aptos para aplicaciones donde el material necesita ciertos requerimientos de inflexibilidad (14).

Dependiendo no solo de la especie de hongo, sino también del tipo de sustrato y su composición, las estructuras fibrosas finales pueden contener determinado contenido de polisacáridos, lípidos, proteína y quitina, afectando las propiedades mecánicas del material. Los materiales cultivados en celulosa tienden a tener más quitina, un módulo de Young más alto y un elongamiento menor que los materiales cultivados en sustratos que contienen dextrosa (azúcares más simples y fáciles de digerir), por lo que se ha concluido que los materiales del micelio se vuelven más rígidos conforme más difícil son de digerir los sustratos por el hongo (14).

El desarrollo del material biológico consiste en inocular un sustrato, previamente desinfectado y con una granulometría específica, en moldes, y proveer la temperatura y humedad relativa necesarios para la incubación y crecimiento del micelio según las condiciones de temperatura, luz y humedad relativa especificadas. Este proceso de incubación puede durar aproximadamente 30 días hasta que el micelio completa la colonización del sustrato y es cuando se debe detener el desarrollo del hongo por deshidratación con el fin de evitar el crecimiento de los primordios y consecuentemente los cuerpos fructíferos (20).

1.2.2 CLASIFICACIÓN

Los hongos son organismos eucariotas, y multicelulares excepto las levaduras. Obtienen su alimento por absorción, al exponer enzimas que se encargan de descomponer distintas sustancias que luego son utilizadas por el hongo para su crecimiento. Existen cerca de 100000 especies reconocidas, divididas en cuatro grupos principales, Zygomycota, Ascomycota, Basidiomycota y Deuteromycota (2).

La mayoría de los hongos son aerobios estrictos, debido a que requieren de oxígeno libre como aceptor de electrones, sin embargo; existen algunos hongos que son anaerobios facultativos y por lo tanto utilizan otras moléculas como aceptores de electrones. Al mismo tiempo, hay otros hongos como los que viven en el rumen de los herbívoros y llamados

anaerobios estrictos, que requieren de condiciones totalmente sin oxígeno para poder sobrevivir (3).

La reproducción se lleva a cabo mayormente de manera asexual cuando las condiciones para su crecimiento son adecuadas. La reproducción sexual tiende a llevarse a cabo cuando las variables de humedad y temperatura no son las óptimas para su crecimiento (2).

Los hongos se pueden dividir dependiendo de la forma en que obtienen sus nutrientes, a saber, en saprófitos (se alimentan de materia orgánica muerta), parásitos (se alimentan de organismos vivos) y simbioses o micorrízicos (forman relaciones simbioses con ciertas especies vegetales) (4).

1.2.3 APLICACIONES DE LOS HONGOS EN LA INGENIERÍA

Muchas actividades industriales como la producción de cerveza, pan, queso, vino y otros productos, requieren de la utilización de levaduras, las cuales corresponden a organismos unicelulares pertenecientes al Reino Fungi, ampliamente utilizadas desde hace cientos de años (5).

Muchos hongos se encargan de degradar sustancias tóxicas. Por ejemplo, *Pleurotus ostreatus* ha sido utilizado en biorremediación de suelos y aguas contaminadas con diesel y metales pesados (ver (6),(7)) o biodegradación de materiales sintéticos como el poliuretano (8). Este mismo hongo ha sido utilizado para la extracción de sustancias con valor medicinal e incluso para la extracción de etanol (9) y control biológico. Se ha estudiado también su utilización para la remoción de la toxicidad de los lixiviados en vertederos y rellenos sanitarios por adsorción (10).

Algunas investigaciones (11) han encontrado mayor capacidad de degradación y mineralización de contaminantes químicos e hidrocarburos poliaromáticos mediante *P. ostreatus* en comparación con el *P. chrysosporium*. Dentro de estos, la mineralización en CO₂ del [14C] catecol, utilizado ampliamente en la fabricación de pesticidas, [14C] el fenantreno, utilizado en la síntesis de fármacos y producción de explosivos, [14C] el

pireno, utilizado en la fabricación de tintes, y [14C] el benzo[a]pireno, resultante de la combustión incompleta de materia orgánica. Y otros compuestos como atrazina, diaminas y fenoles también son degradados de forma similar por estos hongos (12).

Otros estudios han determinado la correlación entre las actividades enzimáticas lignolíticas producidas por hongos, con la remoción de fármacos en aguas residuales, con porcentajes de remoción de 89.47% en diclofenaco, 46.61% en gemfibrozil y 73% en indometacina con el hongo *Pleurotus ostreatus* a temperaturas entre 23°C y 25°C y tiempos de exposición de una hora (13).

Por otro lado, algunas investigaciones recientes han estudiado la utilización de diversos hongos para otro tipo de aplicaciones. El desarrollo de lozas (que funcionan como elementos de mampostería), por ejemplo, sobresale en este sentido, ya que además de reducir el peso en las construcciones, ofrece propiedades físicas como hidrofobicidad y otras características estructurales, termoaislantes, acústico-aislantes, las cuales resultan ventajas de suma importancia a comparación de otros materiales como el concreto (14).

De forma similar, *P. ostreatus* también se ha investigado en la elaboración de materiales de embalaje de electrodomésticos, vinos y otros productos. Estos usos se deben a las características estructurales del hongo, el cual se constituye de filamentos de células alargadas de pared fuerte llamados hifas, que en conjunto le brindan a los hongos características estructurales muy peculiares (15).

1.3 LOS MATERIALES BIOLÓGICOS

1.3.1 GENERALIDADES DE LOS MATERIALES BIOLÓGICOS

Hoy día existe una gran confusión en cuanto a la utilización de la palabra biomaterial y material biológico y es por ellos que muchas personas tienden a utilizar este término indebidamente. Actualmente no existe una única definición de la palabra biomaterial que

haya sido consensuada por acuerdo general entre los expertos en el campo. Sin embargo, las siguientes definiciones dan una idea general de los temas que abarcan esos conceptos:

1. Material utilizado en un dispositivo médico, pensado para interactuar mutuamente con sistemas biológicos.
2. Cualquier sustancia o combinación de sustancias de origen natural o artificial que puede ser usada durante cierto tiempo como un todo o como parte de un sistema que permite tratar, aumentar o reemplazar algún tejido, órgano o función del cuerpo humano.
3. Material sintético empleado para reemplazar parte de un sistema vivo o que está en íntimo contacto con fluidos biológicos (21).

Por otro lado, el término material biológico es el que se utiliza para describir cualquier material que proceda de un ser vivo, por ejemplo, las telarañas, el hilo de seda de los gusanos, la concha de los moluscos y otros como el micelio de los hongos (22). Por lo tanto, esta definición es la más acorde con esta investigación.

Los nombrados materiales biológicos tienen una serie de características que los distinguen de los materiales sintéticos, y son representados por medio del heptaedro de Arzt (Figura 2 A)), de los cuales se pueden enumerar las siguientes propiedades: (i) autoensamblantes, (ii) autocurativos, (iii) con restricciones evolutivas y ambientales, (iv) necesidad de hidratación, (v) condiciones medias de síntesis a 300 K y 1 atm, (vi) multifuncionales, (vii) jerarquía estructural de niveles nano, micro, meso y macro. Además, los elementos de diseño estructural biológico pueden ser de distintos tipos, dentro de los cuales cabe mencionar la disposición como fibras, hélices, gradientes, capas, tubulares, celulares, tipo sutura y superposición, lo cual determina las características de cada material en la naturaleza (1).

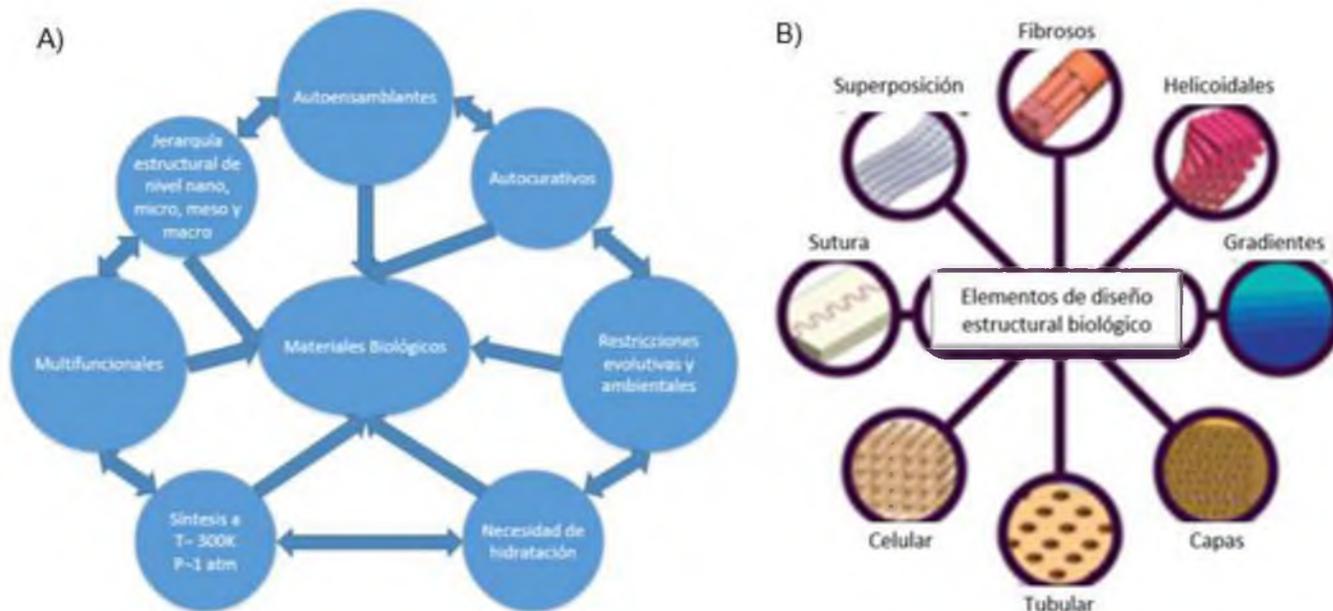


Figura 2. Caracterización de los materiales biológicos:

A) Heptaedro de Arzt, B) Elementos de diseño estructural biológico

Fuente: Elaboración propia basado en: (1)

Por otro lado, estos materiales biológicos siguen una serie de características estructurales como constitución/composición, acomodo, distribución, dimensión, orientación e interfase entre las partículas que lo conforman, lo que altera o cambia sus propiedades. Esto resulta de importancia pues desde hace muchos años, el ser humano ha observado y estudiado algunos materiales biológicos para tratar de traducir sus propiedades en materiales sintéticos de más fácil y controlada fabricación (1).

“Los materiales biológicos pueden dividirse en mineralizados y no mineralizados. En los materiales biológicos mineralizados, la cerámica imparte resistencia a la compresión, filo (bordes cortantes) y rigidez; mientras que los componentes orgánicos imparten resistencia a la tensión, dureza y ductilidad. Por otro lado, los materiales biológicos no mineralizados en general tienen mayor resistencia a la tracción que resistencia a la compresión, ya que son fibrosos” (22).

Hoy día, existen muchas aplicaciones de los materiales biológicos en la industria, por ejemplo, en la industria textil, el algodón, la seda, el lino, la lana, son ampliamente utilizados para la fabricación de prendas de vestir. Estos materiales no son nuevos y por lo contrario, se ha determinado que su utilización se ha hecho desde tiempos milenarios, por ejemplo se ha encontrado evidencia de la producción de ropas hechas a base de lino desde los años 5500 a.c (23). Otros ejemplos son la paja con la que se fabrican los sombreros, el nácar extraído de las conchas para la fabricación de cremas para la piel, el caucho natural, extraído del árbol del mismo nombre, entre otros cientos de ejemplos, como la creciente fabricación de fibras a partir de cultivos como el abacá y el cáñamo.

1.3.2 LOS HONGOS Y LOS MATERIALES BIOLÓGICOS

Muchos de los hongos se alimentan y degradan materiales lignocelulósicos como lo son los residuos agrícolas resultantes de la cosecha, o de subproductos resultantes de la poscosecha y el procesamiento de productos agrícolas como lo son el bagazo obtenido del proceso de extracción de azúcar de la caña y el pasto o paja resultante de la cosecha del arroz. Por otro lado, existen también los residuos de madera, que pueden ser fuente de nutrientes para el crecimiento de los hongos descomponedores comunes.

Una de las ventajas de estos materiales desarrollados a partir de hongos, es que el micelio crece muy rápidamente y por lo tanto se puede obtener una gran cantidad de biomasa mixta en un corto tiempo. Se dice que este hongo tiene un rendimiento promedio del 20% del peso del sustrato que lo contiene (24). Sin embargo, el crecimiento también se ve influenciado o determinado por factores genéticos, de producción o factores ambientales que pueden ser modificados con el fin de obtener características nuevas o mejoradas. Uno de estos factores es el tipo de sustrato, el cual puede variar en su composición química o estructural; por ejemplo, es común encontrar en residuos agrícolas, valores entre 30 y 45% de celulosa y de 3 a 13 % de lignina, mientras que en residuos de madera se encuentran entre 45 y 56% de celulosa y 18-30% de lignina (11). Esta degradación de biopolímeros de celulosa, hemicelulosa y lignina, se lleva a cabo por medio de un complejo sistema de

enzimas hidrolíticas que liberan al medio para su descomposición y posterior aprovechamiento (24), pudiéndose así degradar la celulosa de los sustratos y convirtiéndola en quitina, que actúa como adhesivo, uniendo las partículas de sustrato y permitiendo la obtención de materiales con propiedades únicas. La lignina es mineralizada en CO₂ y agua. Estos hongos producen además lacasas y peroxidasas que en conjunto con enzimas descomponedoras de celulosa y hemicelulosa, permite hidrolizar los sustratos y absorber más fácilmente los azúcares simples para crecer (9).

El éxito en la obtención de materiales biológicos consiste en la interacción de factores internos y externos. Dentro de los factores internos (Figura 3) se puede mencionar la genética del hongo y los materiales o sustratos a utilizar (composición y granulometría), mientras que dentro de los factores externos se puede mencionar el manejo (método de siembra y procedimientos) y el ambiente de incubación (temperatura y humedad relativa).



Figura 3. Factores que influyen en la elaboración del material biológico

La literatura no contiene evidencia convincente de que la degradación de los biopolímeros de lignina pueda ser llevada a cabo en condiciones anaeróbicas, por lo que se sugiere que la ligera descomposición en condiciones anaeróbicas de este compuesto en algunos casos

reportados se puede atribuir al bajo peso molecular de fragmentos presentes en las muestras, liberadas a través de la acción de hemicelulasas y estereasas o liberadas abióticamente durante largas incubaciones. Esto debe considerarse en la metodología de siembra e incubación del sustrato, pues puede sugerir que se requiera de oxígeno a partir de determinada fase de incubación (25).

Estas enzimas son de suma importancia pues se encargan de degradar compuestos complejos en compuestos más simples y fáciles de asimilar por parte del hongo, y entre estas se puede mencionar la celulasa, hemicelulasa, manganos peroxidasa, versátil peroxidasa, alcohol aril oxidasa y lacasa (25).

Algunos estudios han encontrado una selectividad por degradación de la lignina por parte del hongo *Pleurotus ostreatus*, de hasta un 20% de la materia orgánica en 30 días, la cual es menor y más lenta que la del hongo *Pleurotus chrysosporium*, que presenta una degradación no selectiva del 55% de la materia orgánica en tan solo 15 días (11).

“La naturaleza proporciona a los organismos vivos la posibilidad de crear gradientes en los materiales que produce, teniendo en cuenta las innumerables variables químicas, estructurales y geométricas que pueden ser adaptadas. En el contexto de los procesos de diseño y evolución de los materiales, los gradientes se asocian fundamentalmente con los cambios en dos tipos de ingredientes, es decir, composiciones, constituyentes químicos y características estructurales que implican adicionalmente disposición, distribución, dimensiones y orientaciones de las unidades de construcción estructural” (1).

1.3.3 APLICACIÓN DE MATERIALES BIOLÓGICOS EN LA INGENIERÍA

Actualmente diversas especies de hongos están siendo estudiadas para su empleo en múltiples aplicaciones ingenieriles, como sustitutos de materiales comunes utilizados en la actualidad y cuya fabricación conlleva grandes impactos ambientales. Otras aplicaciones

pueden comprender la fabricación de materiales aislantes térmicos o acústicos, resistentes a golpes para su aplicación en industrias de construcción, automovilísticas, textiles u otras.

En la actualidad existe escaso pero creciente conocimiento sobre el uso de materiales biológicos diseñados a partir de hongos que puedan funcionar como sustitutos de materiales de uso común como el plástico o el poliestireno expandido, los cuales son derivados del petróleo u otras sustancias cuyas huellas ambientales son altas.

La falta de estudios en la aplicación de tecnologías de bajo costo para el desarrollo de materiales biológicos producidos a partir de organismos vivos tiene un alto potencial en países en desarrollo como Costa Rica, en los cuales, a pesar de la alta variedad de hongos, existe poca integración de conocimientos biológicos con aplicaciones ingenieriles asociadas al desarrollo sostenible. Por ello, resulta importante explorar nuevas alternativas de desarrollo tecnológico con modelos de trabajo multidisciplinarios que contribuyan con la reducción del daño al ambiente, la emisión de gases de efecto invernadero y por consecuencia con la adaptación al cambio climático.

Por otro lado, resulta de suma importancia aportar alternativas económicamente viables para zonas geográficas y sectores sociales fuera de los cascos urbanos, donde se tiene disponibilidad de materias primas y otros recursos que puedan ser fácilmente utilizados bajo una tecnología no muy avanzada que además sea sencilla de implementar y responsable ambientalmente.

1.4 LOS MATERIALES UTILIZADOS MÁS COMUNES Y SU HISTORIA

La aparición de los distintos materiales utilizados en la actualidad ha acontecido con el pasar de los años, como respuesta a las necesidades del ser humano y a las aplicaciones que este utiliza para su diario vivir. Todos estos materiales han surgido gracias a las tecnologías emergentes, respuesta de las distintas revoluciones industriales, generando una gran gama de materiales con diversas propiedades (26).

Algunos materiales como los metales y sus aleaciones surgieron a inicios del Siglo 18, con la primera revolución industrial, la cual fue clave en el desarrollo de máquinas movidas mecánicamente por agua y vapor. La segunda revolución industrial, surgió a inicios del Siglo 20 cuando se comenzó a introducir las líneas de producción en masa en la industria, con el uso de la energía eléctrica y con el estudio de la física y química de materiales. Estos materiales abarcan cerca del 80% de los utilizados en la actualidad. La tercera revolución industrial surgió a partir de los años 70's con la tecnificación y modernización de las líneas de producción a partir de los componentes electrónicos, desarrollados controlando computacionalmente los procesos y tomando en cuenta la física y química de materiales (26).

Finalmente, la última revolución industrial es la que contempla los tiempos más modernos, e involucra los sistemas físicos-cibernéticos cuyas operaciones son monitoreadas, coordinadas, controladas e integradas por el núcleo informático y de comunicaciones, como lo son las impresoras 3D (26).

Los principales materiales utilizados en la ingeniería se dividen en cuatro grupos, llamados, metales y aleaciones (ferrosos y no ferrosos), cerámicas (no metales inorgánicos constituyentes unidos por enlaces covalentes o iónicos), polímeros (hules, plásticos y adhesivos) y compuestos (mezcla de dos materiales distintos unidos por la aplicación de calor y presión por un tiempo determinado), siendo los metales y sus aleaciones, los materiales más ampliamente usados en la ingeniería en la actualidad (22).

Muchos de los materiales utilizados hoy día, son escogidos debido a sus propiedades como dureza, porosidad, maleabilidad, ductilidad, permeabilidad, resistencia a las distintas cargas aplicadas, capacidad de transferencia térmica, entre otros cientos de propiedades. Muchas de estas propiedades existentes en cualquiera de los grupos de materiales utilizados comúnmente en la ingeniería, podrían ser emuladas con el desarrollo de materiales biológicos, lo que justifica seguir una línea de investigación bastante agresiva en este campo.

Entre los materiales más utilizados en aplicaciones industriales y de ingeniería, se puede mencionar el plástico. La producción de este material se mantuvo en crecimiento constante desde 1950 con un incremento anual promedio de 13.6% por 26 años consecutivos. Este crecimiento fue desacelerándose poco a poco sin embargo se alcanzó en el año 2012 un máximo histórico de 288 millones de toneladas anuales (27).

China es el país con mayor producción de plástico en el mundo con un 24%, lo cual sumado al 21% producido por Japón y otros países asiáticos, hacen de este continente el mayor productor de este material, lo cual tiene repercusiones ambientales de importancia (27).

Actualmente existen cerca de 80000 tipos de plástico registrados, que constan de distintas mezclas de aditivos que le proveen diversas propiedades. Estos plásticos en muchas ocasiones se encuentran protegidos por patentes, convirtiendo esas mezclas en secretos industriales, lo cual es riesgoso pues el consumidor desconoce su composición. Muchos de los aditivos agregados son bisfenoles, ftalatos, cloruro de vinilo, estireno, retardantes de llama y metales pesados, la mayoría de estos cancerígenos o tóxicos para el organismo (28).

Si bien; el plástico es con normalidad uno de los componentes más utilizados en la fabricación de objetos, hay un sinnúmero de otros materiales que pueden ser utilizados en la fabricación de estos, que además de ser contaminantes ambientales, pueden representar riesgo para la salud del ser humano, por ejemplo, el poliestireno expandido.

Por otro lado, materiales como el cemento, que no es sintético, tienen un crecimiento constante en su producción, siendo el norte de Asia el principal productor.

Estas métricas son alarmante puesto que la industria del cemento es responsable del 5% del total de emisiones de CO₂ generadas por el hombre, y además es una industria que requiere de un consumo de energía térmica bastante elevado (Cuadro 2).

Cuadro 2. Indicadores de desempeño en la producción cementera mundial

Variable	1990		2010		2011	
	Mundo	Latinoamérica	Mundo	Latinoamérica	Mundo	Latinoamérica
Producción de Clinker cubierto por GNR (millones de toneladas)	421	41	634	77	665	82
Producción de material cementante cubierto por GNR (millones de toneladas)	511	50	840	110	888	118
Emisiones específicas brutas de CO ₂ (kg CO ₂ /Tonelada de producto cementante)	761	709	654	613	646	601
Emisiones específicas netas de CO ₂ (kg CO ₂ /Tonelada de producto cementante)	756	713	638	605	629	590
Consumo de energía térmica por producción de Clinker (MJ/tonelada de Clinker)	4259	4092	3584	3703	3561	3623
Consumo de energía eléctrica por producción de cemento (kWh/tonelada de cemento)	116	116	110	112	107	107
Volumen combustibles fósiles alternos (millones de toneladas)	2.4	0.1	13.4	1.3	12.8	1.4
Volumen de combustibles de biomasa (millones de toneladas)	0.3	0.3	5	0.8	5.3	0.9

Fuente: Elaboración propia basado en (29)

Si bien se observa, las emisiones específicas de CO₂, se han reducido como respuesta a la utilización de combustibles alternativos más eficientes, permitiendo la reducción de la dependencia de los combustibles fósiles tradicionales; estas cifras no dejan de ser alarmantes en relación con el cambio climático y la disminución en las emisiones de gases de efecto invernadero.

1.5 LA MATRÍZ DE RESIDUOS ORGÁNICOS EN COSTA RICA

Costa Rica cuenta con una importante producción agrícola y forestal, las cuales generan gran cantidad de residuos, que son utilizados en la producción de energías u otros usos. En el peor de los casos, estos residuos terminan representando un riesgo fitosanitario de importancia por no dárseles un adecuado manejo. En el Cuadro 3 se puede observar la estimación de la biomasa húmeda, seca y la energía primaria por tipo de residuo agrícola orgánico (RAO) en los distintos sectores productivos para el 2012:

Cuadro 3. Estimaciones de biomasa húmeda, seca y energía primaria por tipo específico de RAO en Costa Rica

Sector		RAO	Biomasa húmeda (Ton)	Biomasa seca (Ton)	Energía primaria (TJ)
Agrícola	Café	Pulpa	273.871,9	52.035,7	826,3
		Cascarilla	28.308,9	25.194,9	451,7
		Mucílago	102.702,0	19.513,4	309,9
	Arroz	Granza	62.642,0	38.248,8	590,2
	Caña de azúcar	Bagazo	1.001.438,0	500.719,0	8.762,6
		Cachaza	1.20.725,6	301.737,6	4.827,8
		Melaza	1.402.013,2	701.006,6	6.827,8
		R. Campo	929.334,5	278.800,3	4.859,5
	Palma africana	Fibra de mesocarpio	144.462,5	91.011,4	1.768,4
		Cascarilla de coquito	55.562,50	46.116,9	1.057,5
		Fibra de pinzote	244.475,0	110.013,8	2.048,5
	Cítricos	Residuos de naranja	140.000,0	21.000,0	347,6
	Piña	Rastrojo de piña	8.158.262,5	815.826,2	9.463,6
		Corona	7.454,2	1.602,7	18,6
Banano	Pinzote de banano	183.193,7	27.479,1	316,8	
	Banano rechazo	222.171,1	33.325,7	384,2	
Forestal	Aserraderos	Aserrín	102.771,0	69.884,3	1.292,9
		Leña	189.098,7	94.549,4	1.749,2
		Otros residuos de aserrío	110.992,7	49.946,7	924,0
		Burucha	8.221,7	5.549,6	102,7

Fuente: (30)

Nota: El término orgánico se refiere a su naturaleza y no a si son producto de técnicas orgánicas de producción. La energía primaria es una estimación de la energía potencial disponible en la biomasa seca y su cálculo fue obtenido en el proyecto citado por medio de balances de energía.

Según el cuadro anterior, se puede observar que existe gran cantidad de biomasa aprovechable procedente de las distintas actividades agrícolas practicadas en el país, siendo la caña una de las actividades que más aporta biomasa junto con la piña. Mientras que, en el sector forestal, la cantidad de biomasa aportada no es significativa si se compara estos últimos. Esto resulta importante pues significa que existe disponibilidad suficiente de materia prima para su utilización en diversos usos, incluyendo la fabricación de materiales biológicos, que pueden beneficiar al ambiente y ser fuente de empleo en el contexto rural, impactando positivamente en el ámbito social.

Por otro lado, la mayoría de estos residuos agrícolas no reciben tratamiento, siendo su principal problema el ser considerados como simples desechos, llegando incluso a representar un riesgo fitosanitario debido a su mala disposición, afectando la salud de personas, animales, e incluso representando un riesgo potencial de contaminación de fuentes de agua.

Una buena parte de los residuos generados en las fincas, se les logra dar alguna utilidad como la producción de abono (compost), energía por medio de su quema o por medio de biodigestión, alimento para animales o cobertura vegetal, entre otros usos (ver Cuadro 4). Sin embargo, otra gran porción de los mismos por sus características físicas o químicas no son tan adecuados para dichas aplicaciones, por lo que podría explorarse la posibilidad de utilizarlos en el desarrollo de materiales biológicos y de esa forma no solo darles un valor agregado, sino reducir los efectos adversos de su inadecuado manejo. De esta forma, aprovechando que se cuenta con una buena base de trabajo para producción de hongos mediante la utilización de sustratos como los mencionados anteriormente y muchos otros, es que se puede plantear el estudio del uso potencial de estos residuos agrícolas en distintas aplicaciones biológicas.

Cuadro 4. Total de fincas con actividad agrícola por principal tipo de tratamiento de residuos según provincia

Provincia	Total de fincas	Cantidad de fincas por tipo de tratamiento de residuos utilizado						
		Cobertura vegetal	Abono	Fuente de energía	Alimento para los animales	Otro	No los trata	% de fincas con residuos no tratados
San José	17,574	6,707	3,712	140	208	100	6,707	38%
Alajuela	21,057	5,417	5,108	83	688	258	9,503	45%
Cartago	8,320	1,787	2,793	21	201	119	3,399	41%
Heredia	4,016	1,154	1,322	5	166	36	1,333	33%
Guanacaste	7,300	854	956	24	599	57	4,810	66%
Puntarenas	12,802	3,034	2,161	42	250	108	7,207	56%
Limón	7,339	946	1,395	9	375	103	4,511	61%
Total	78,408	19,899	17,447	324	2,487	781	37,470	48%

Fuente: Elaboración propia con base en (31)

Nota: El censo Agropecuario en relación con el tratamiento de residuos, únicamente registra la cantidad de fincas y no otro tipo de métricas como masa o volumen de residuos orgánicos.

1.6 CARACTERÍSTICAS DE LOS SUSTRATOS Y GRANULOMETRÍAS.

Los nutrientes requeridos por el hongo para crecer suelen ser algunas fuentes de carbono como lo son el almidón, glucosa, fructosa, maltosa, manosa, sacarosa, pectina, celulosa y lignina. Además, requiere de fuentes de nitrógeno como lo son la peptona, licor de maíz, torta de soja, polvo de levadura, sulfato de amonio, asparagina, serina, alanina y glicina (19). De modo que cualquier sustrato que le provea alguna(s) de estas sustancias, le permitirá al hongo alimentarse, reproducirse y crecer, siempre y cuando también se favorezca sus condiciones de temperatura y humedad relativa adecuadas.

El hongo debe alimentarse de materiales lignocelulósicos con cierto contenido de azúcares que le permitan desarrollarse y crecer. Estos materiales pueden ser residuos agrícolas crudos como rastrojos de piña, banano, maíz, café, también restos de aserrío de madera o incluso residuos de algunos procesos agroindustriales como el bagazo de caña, resultante del proceso de extracción del azúcar de la caña. El tamaño de la partícula puede ser determinante en la forma y rapidez con la que el hongo crezca en el mismo, ya que, a menor tamaño, habrá mayor área superficial y por tanto mayor disponibilidad de nutrientes para el crecimiento del hongo; aunque un mayor tamaño puede ofrecer al material otras características estructurales importantes. Suele utilizarse rastrojos de frijol, coronas de piña, cogollos de plátano, bagazo de caña, fibra de coco, alfalfa, pasto trasvala y arroz, entre otros (32).

La longitud del material triturado de trigo *Triticum sp.* utilizado en una investigación para la fabricación de un material biológico sustituto del poliestireno expandido fue de entre 2-5 cm (33), sin embargo, es necesario conducir ciertos ensayos para determinar las granulometrías más favorables para la producción de un material biológico a utilizarse en otras aplicaciones y no solo para la producción de hongos para consumo.

“El bagazo es un residuo lignocelulósico fibroso remanente de los tallos de caña, que se obtiene a la salida del último molino del tándem azucarero, el cual constituye un conjunto heterogéneo de partículas de diferentes tamaños que oscilan entre 1 y 25 mm, presentando una fracción promedio de aproximadamente 20 mm. Desde el punto de vista físico, el bagazo integral se compone de 45% de fibra, 2-3% de sólidos insolubles, 2-3% de sólidos solubles y 50% de humedad, mientras que, desde el punto de vista químico, se compone de 46,6% de celulosa, 25,2% de hemicelulosas (pentosanos) y 20,7% de lignina en base húmeda” (34). Esta información resulta valiosa pues dependiendo del comportamiento mecánico del material desarrollado, se podría asociar el efecto de los distintos componentes estructurales del sustrato (lignina, celulosa, fibras, sólidos solubles, etc).

1.7 PROCEDIMIENTO DE MANEJO Y PRODUCCIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

El crecimiento del micelio y su fructificación, así como el resto de las etapas de crecimiento del hongo, son regulados por la temperatura, el ambiente gaseoso, el estatus de nutrimentos, la actividad del agua y las condiciones de luz (35). Es por ello que un control adecuado del ambiente donde se incuba el micelio con el sustrato es clave para el crecimiento adecuado del hongo. Por otro lado, es necesario encontrar el método de siembra óptimo para la obtención del material deseado, ya sea en cuanto al requerimiento espacial y del material utilizado como molde, de modo tal que se obtenga la matriz de micelio desarrollado lista para su utilización en las distintas aplicaciones.

Es preciso delimitar adecuadamente todos los requerimientos y parámetros manipulables y manejables a fin de obtener siempre las mismas propiedades en el material.

La dinámica de elaboración de este material comienza con la selección del sustrato (Figura 4), el cual debe suplir las necesidades nutricionales del hongo. Este sustrato debe ser secado y readecuado a tamaños de partícula fácilmente digeribles y procesables por el hongo pues a menor tamaño de partícula, mayor es la relación de área superficial, favoreciendo la colonización del hongo. Este sustrato debe ser humedecido y desinfectado, de modo que se elimine cualquier otro microorganismo que pueda causar contaminación o representar competencia por nutrientes con el hongo. Algunas investigaciones realizan esta desinfección en agua a 85°C por 120 minutos (33), otras sugieren una temperatura de agua de 90°C con un tiempo de exposición de 45 minutos (4), mientras que algunas otras plantean una desinfección en autoclave por 30 minutos a 20 psi (36) y otros a 121-135°C por 2 a 3 horas (20). Luego de este proceso, el sustrato se encuentra listo para la inoculación con micelio del hongo *Pleurotus ostreatus*, variedad PL1, en cual se encargará de invadir el sustrato y digerir los compuestos lignocelulósicos para su crecimiento. La cantidad óptima de semilla a agregar es de aproximadamente el 20% del peso de la muestra.

Los parámetros temperatura y humedad deben ser controlados a lo largo de todo este proceso a fin de promover un adecuado crecimiento del micelio en el sustrato, sin embargo, se recomienda una temperatura óptima de 28°C y una humedad relativa del 85% (32). Los primeros 15 días del proceso de incubación se llevan a cabo con los recipientes tapados, de manera que se induzca el crecimiento del micelio. Luego se dejan abiertos dentro de la incubadora, donde se finaliza el proceso de incubación. El tiempo total de desarrollo del material depende estrictamente del sustrato, los parámetros ambientales como también de la calidad y estado del inóculo utilizado, por lo que puede variar entre ensayos, sin embargo, la duración aproximada es de un mes para alcanzar la formación completa del material. Para esta investigación, el diagrama de flujo del proceso fue el mostrado en la Figura 4.

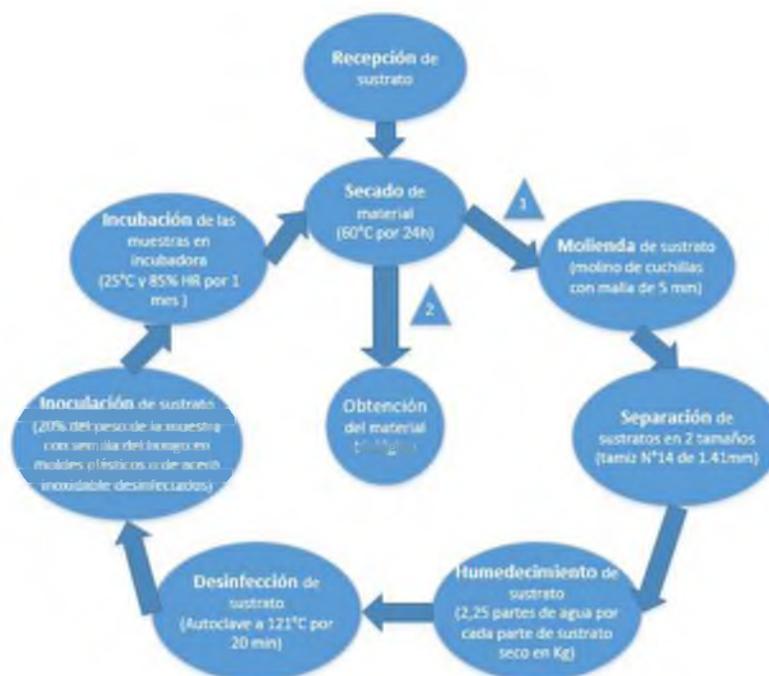


Figura 4. Diagrama de flujo del proceso llevado a cabo para la elaboración del material biológico.

1.8 HIPÓTESIS DE TRABAJO

Debido a que el hongo *Pleurotus ostreatus* puede tener preferencia de crecimiento por alguno de los sustratos debido a su composición química o estructural y la granulometría de

este (tamaño promedio de partícula), se cree que estas variables pueden afectar las características mecánicas del material resultante, por lo que resulta interesante plantear como hipótesis de este proyecto, que *el tipo de sustrato y su granulometría, afectan el crecimiento micelial y por tanto también las características físico-mecánicas del material biológico a desarrollar*. Efectivamente, esto se sustenta en algunos estudios donde se ha demostrado que los materiales del micelio se vuelven más rígidos conforme el sustrato es más difícil de digerir (14), lo cual está estrechamente relacionado con la afirmación realizada por Liu et al.(37), quienes mencionan que “la mayoría de los gradientes en los materiales biológicos están vinculados en un grado variable a las variaciones en las composiciones químicas locales o constituyentes”. Estos mismos autores afirman también que muchas propiedades y funciones de los materiales biológicos están determinadas en gran medida por las dimensiones de sus componentes(1).

En el concreto armado, se utiliza barras de acero con el fin de dar al concreto una mayor capacidad de resistencia a esfuerzos de tensión (38). De igual manera que con la chorrea de un piso, en el cual se utiliza una malla electrosoldada como elemento que brinda resistencia al concreto. Para el diseño de este material se pretende utilizar una malla fina que brinde al material una mayor resistencia mecánica, permitiendo al sustrato y al micelio, entrelazarse con la malla, afectando sus propiedades físico-mecánicas y estructurales. Esta malla será utilizada en cada muestra, formando capas entre el sustrato.

CAPÍTULO 2. ARTÍCULO CIENTÍFICO

“¿Es posible crear un material biológico para aplicaciones ingenieriles utilizando el hongo *Pleurotus ostreatus*?: Un estudio de caso”

Fabián David Jiménez Rey

Resumen

En este estudio se evaluó la posibilidad construir un material biológico elaborado a partir de sustratos de desecho agroforestal y del hongo *Pleurotus ostreatus* como opción de utilización en aplicaciones ingenieriles. Para ello, se realizaron ensayos de crecimiento hifal, con cuya información se escogieron dos sustratos para construir un material biológico. Con un ensayo final de crecimiento se construyó el material que fue analizado a partir de una serie de pruebas físico-mecánicas para evaluar su aptitud como sustituto de materiales comúnmente utilizados como el poliestireno expandido, el plástico o incluso el concreto. Se determinó que el bagazo de caña (*Saccharum officinarum*) y el pasto de arroz (*Oriza sativa*) fueron los mejores sustratos utilizados para la siembra del hongo. Posteriormente se evaluaron dos granulometrías para determinar la capacidad de formación de un material biológico. Con el material construido se realizaron pruebas de densidad y de cargas de flexión, tomando como referencia las normas ASTM C303-10 y ASTM C203-05 respectivamente. Los valores mayores de densidad fueron registrados en las muestras donde se utilizó una mezcla de pasto de arroz fino con pasto de arroz grueso con valores promedios de 132 kg/m^3 , por otro lado, el esfuerzo máximo a flexión lo presentó la muestra en la cual se utilizó una mezcla de pasto de arroz grueso con bagazo, con valores de 0.08 MPa, mientras que no existió diferencias significativas en los módulos de elasticidad medidos de ambos materiales.

Palabras clave: ambiente, material biológico, micelio, propiedades mecánicas, residuos agrícolas orgánicos.

Abstract

The possibility of generating a biological material made with substrates of agroforestry waste and the fungus *Pleurotus ostreatus* was evaluated in this study. The idea was to offer an option of use in engineering applications. For this, a series of hyphal growth trials were carried out, and two substrates were chosen to build a biological material with such information. With a final growth test, the material was constructed and tested using a series of physical-mechanical assessments to determine its capacity to substitute common materials like expanded polystyrene, plastic or even concrete. Sugarcane bagasse (*Saccharum officinarum*) and rice grass (*Oriza sativa*) were the best substrates. Based on this information, two granulometries were used to evaluate the capacity of formation of a biological material. Density and Flexural tests were carried out using as reference the standards ASTM C303-10 and C203-05 respectively. Significant differences as well as higher values of density were observed in the trials made with a combination of fine rice grass and thick rice grass with average values of 132 kg/m^3 . Conversely, maximum fiber stress values were higher in the materials made with thick rice grass and fine bagasse with values of 0.08 MPa. No statistically significant differences were recorded in the elastic modulus between both materials.

Keywords: Agricultural wastes, biological material, environment, mechanical properties, mycelium.

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos son organismos que ofrecen gran gama de funciones, siendo utilizados actualmente en distintas aplicaciones debido a sus múltiples propiedades. Su capacidad de degradación de moléculas complejas en sustancias más simples es una de estas características. Muchos hongos son capaces de degradar sustancias tóxicas y son utilizados en la recuperación de suelos contaminados con metales pesados o para descontaminar aguas

residuales con fármacos (ver (1), (2) y (3)). Otros hongos son capaces de descomponer sustancias como el poliuretano cuya degradación independiente es muy lenta (4).

Debido a dicha capacidad natural de degradación de sustancias, el uso de hongos ha capturado el interés de la industria y actualmente existen diferentes líneas de trabajo con este grupo de organismos. Una de ellas es la degradación de residuos orgánicos provenientes de las actividades agrícolas y forestales. Costa Rica cuenta con una amplia matriz de residuos de este origen. Estos materiales son utilizados en aplicaciones como abonos, coberturas, alimentación animal y producción de energías. Sin embargo, cerca del 48% de las fincas de todo el país no lleva a cabo ningún tratamiento a los residuos agrícolas, lo que aumenta el riesgo para la salud de las personas y los animales, debido al manejo inadecuado de los mismos. Lo anterior puede generar la proliferación de plagas como ratas, insectos, y agentes causantes de enfermedades pues muchos de estos residuos son dispuestos libremente al ambiente para su degradación (5) e incluso sus efluentes pueden percolarse en el suelo, produciendo problemas de contaminación.

Actualmente, existen fuertes iniciativas internacionales para originar tecnologías más amigables con el ambiente que permitan reducir los efectos del cambio climático (6). Este tipo de propuestas son muy importantes e incluyen la creación de materiales alternativos con alto potencial y que provienen de la utilización secundaria de materias primas, como por ejemplo residuos agrícolas o forestales. De esta forma, existe mucha presión para sustituir materiales comunes como el plástico, el concreto y el poliestireno expandido, que son muy caros energéticamente y muy contaminantes desde el punto de vista ambiental. De forma similar, es muy alta la presión por eliminar el uso de compuestos tóxicos presentes en plásticos, como el difenilo polibromado (4), presente en muebles, televisores, y otros electrodomésticos.

Es por ello que resulta imperativo realizar una fuerte promoción sobre la utilización de materiales biológicos, principalmente aquellos que provienen de residuos, que puedan ser sustitutos de los materiales comunes. Lo anterior permite ofrecer un valor agregado a los

residuos y ayuda a disminuir los riesgos de contaminación y enfermedades asociados al mal manejo de estos residuos. Al mismo tiempo, la utilización de estos materiales, biodegradables por naturaleza, puede representar una disminución en los costos de tratamiento y disposición de éstos, lo que se traduce en una baja huella ambiental y a su vez, en un mayor beneficio social.

Dentro de ese contexto, el hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*) es un organismo que, por sus características bioquímicas, puede ser usado para la creación de materiales biológicos a partir de residuos agroforestales. Lo anterior responde a su capacidad de unir trozos de material orgánico en una matriz compacta por medio de la proliferación de hifas. Este hongo, que es además comestible, es un descomponedor primario que degrada la lignina y celulosa, por medio de las enzimas hidrolíticas que libera para luego absorber los nutrientes y crecer(7). El crecimiento del micelio se da por la extensión de la membrana celular y la pared celular en la punta de las hifas (8). Este crecimiento es muy acelerado cuando se proveen condiciones de temperatura entre 25 y 28°C, una humedad relativa de aproximadamente 80% (9) y una concentración de CO₂ alta (10), lo que permite la formación de un material que se autoensambla y crece en un corto periodo (11).

El presente trabajo ha sido desarrollado como una estrategia para evaluar la capacidad de crear un material biológico utilizando residuos agroforestales y el hongo ostra. El objetivo general es caracterizar el procedimiento de creación de tal material y evaluar un protocolo de construcción de este como estrategia para la determinación del potencial real de esta tecnología en aplicaciones del mercado costarricense. Algunas características de los materiales finales han sido contrastadas con las del poliestireno expandido como una forma de ofrecer una comparación con un material de alto uso industrial en un contexto de sostenibilidad ambiental. Este trabajo se basó en la premisa de ofrecer una alternativa de aplicación a la matriz hongo-sustrato formada para un proceso comercial de producción de materiales biológicos a partir de este hongo.

2. METODOLOGÍA

Este proyecto se llevó a cabo entre los años 2017 y 2018 en las instalaciones del Instituto de Investigaciones en Ingeniería (INII) de la Universidad de Costa Rica, en los laboratorios de Fitopatología y Entomología de la Escuela de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Costa Rica (UNA) y en el Laboratorio de estructuras del Laboratorio Nacional de Materiales y Modelos Estructurales (LANAMME) de la Universidad de Costa Rica. El estudio se ha enmarcado como la parte central del trabajo final de graduación de licenciatura de la Escuela de Ingeniería de Biosistemas de la Universidad de Costa Rica.

2.1 PRUEBAS PRELIMINARES Y SELECCIÓN DE SUSTRATOS

Se llevaron a cabo una serie de pruebas preliminares en el Laboratorio de la Unidad de Recursos Forestales del Instituto de Investigaciones en Ingeniería de la Universidad de Costa Rica, que consistieron en la siembra del hongo con 1) bagazo de caña (*Saccharum officinarum*) obtenido por donación de Ingenio el Palmar en Miramar de Puntarenas, 2) pasto de arroz y 3) granza de arroz (*Oriza sativa*) obtenidos de un almacén de agro insumos, 4) raquis de banano (*Musa sp*) y aserrines de 5) guapinol (*Hymenaea courbaril*), 6) pino (*Pinus radiata*), 7) teca (*Tectona grandis*), 8) roble coral (*Terminalia amazonia*) y 9) guanacaste blanco (*Enterolobium cyclocarpum*) disponibles de la colección de aserrines de la Unidad de Recursos Forestales. El objetivo de estas pruebas preliminares fue la escogencia de dos sustratos sobre los cuales se realizarían las pruebas finales. Los criterios bajo los cuales se realizó esta escogencia se basaron en una evaluación cualitativa visual de la rapidez, el porcentaje y uniformidad de la superficie cubierta por el micelio en el sustrato, así como de la consistencia al tacto de los materiales obtenidos al final del proceso de incubación. Finalmente, otro criterio de peso para la escogencia de los sustratos consistió en que los mismos fueran de fácil obtención, y que además constituyeran algunos

de los que mayor disponibilidad representan dentro de la matriz de residuos agrícolas orgánicos del país.

Además del estudio de los sustratos, se realizaron variaciones en el método de siembra con el fin de optimizar la cantidad de inóculo, la humedad del sustrato, el tiempo de incubación, la temperatura de incubación y el tipo de molde. Primero, se realizaron pruebas de crecimiento variando la cantidad de inóculo con siembras del 5%, 10%, 20% y 25% del peso de sustrato húmedo por cada muestra. De forma similar se varió el tiempo de incubación, al probar valores de 15, 20 y 30 días. Finalmente, se probaron temperaturas de incubación de 26°C, 27°C y 28°C y humedecimientos de la siembra con 2 y 5 ml de agua destilada cada tres días. Los distintos moldes utilizados comprendieron platos Petri, beakers, vasos plásticos, bolsas plásticas, recipientes plásticos de alimentos y recipientes de aluminio para alimentos y se emplearon también membranas de tela, mallas plásticas y metálicas como materiales de separación entre los moldes y el sustrato inoculado. Los resultados de estas pruebas preliminares permitieron escoger tanto el pasto de arroz grueso como el pasto de arroz fino y el bagazo fino para llevar a cabo las pruebas finales bajo las condiciones más favorables de crecimiento micelial.

2.2 INDUCCIÓN DEL CRECIMIENTO MICELIAL Y TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES PARA LAS PRUEBAS FINALES

La metodología utilizada se basó en las técnicas comunes llevadas a cabo para la producción de hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*) para consumo alimenticio (ver (9) (12), (13),(14)) con la diferencia que se utilizaron recipientes de aluminio para alimentos de 20 x 10 cm, que sirvieran como molde para la formación del material.

Según se mencionó, de acuerdo con las pruebas preliminares, se utilizaron únicamente bagazo fino y pasto de arroz tanto grueso como fino. Ambos sustratos se sometieron a un proceso de astmido en una estufa para materiales foliares por 48 h a 60°C para favorecer el proceso de molienda. Los sustratos debidamente secos fueron molidos por medio de un

molino de cuchillas Marca Thomas Scientific, Wiley mil, modelo 4 con una malla de orificios de 5 mm para obtener partículas de ese tamaño y más pequeñas. El sustrato molido fue a su vez separado en dos grupos por medio de un tamiz N°14 marca U.S. Standard Sieve Series, con orificio de 1.41 mm. Tras este proceso, se obtuvieron partículas con dos granulometrías distintas; una granulometría “gruesa” de partículas entre 1.41 mm y 5 mm, y una granulometría “fina” de partículas entre 1.41 mm y de menor tamaño. Estos tres primeros procesos se realizaron en el laboratorio del área de Fertilidad de Suelos y Nutrición del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica (CIA). Las granulometrías seleccionadas para los ensayos finales fueron el bagazo fino (no el grueso) y el pasto de arroz tanto fino como grueso.

Tras este proceso, el material seco, molido y clasificado por tamaño fue debidamente empacado en bolsas plásticas y trasladado a los laboratorios de Fitopatología y Entomología de la Escuela de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Costa Rica (ECA-UNA), en donde se llevó a cabo la esterilización de los sustratos, la siembra y la incubación. Para ello, cada sustrato fue humedecido en una relación 2.25:1 masa/masa (2.25 partes de agua destilada por cada parte de sustrato seco) e introducidos en bolsas de polipropileno de 22 cm x 31 cm. Estas bolsas fueron a su vez introducidas en bolsas de papel Kraft para su protección contra el calor.

Las bolsas con los sustratos en su interior, así como los recipientes de aluminio que funcionaron como moldes, se sometieron a un proceso de esterilización a 121°C y 15 PSI por 30 minutos en una autoclave modelo SA-500 de Sturdy Industrial CO., LTD. Luego del proceso de esterilización, el sustrato se sacó de la autoclave y se dejó enfriar a temperatura ambiente en una cámara de flujo laminar marca Bioquest Biological Cabinet, modelo 60474 por 20 minutos.

El inóculo de *Pleurotus ostreatus*, variedad PL1 fue obtenido de la empresa Biofungi S.A y se mantuvo empacado en su bolsa de polipropileno en refrigeración a 4°C hasta el momento de su utilización, cuando fue sacado del refrigerador y mantenido a temperatura

ambiente por 1 hora. Debidamente desinfectado el sustrato y a temperatura ambiente, se realizó la siembra del inóculo en la cámara de flujo laminar con el fin de reducir la posibilidad de contaminación. Los diferentes tratamientos experimentales consistieron en realizar mezclas de los dos distintos sustratos y sus respectivas granulometrías para posteriormente agregar el inóculo del hongo. Los tratamientos de mezclas de sustrato fueron denotados como 1) para la mezcla de 50% bagazo fino y 50% pasto grueso, 2) para la mezcla de 50% pasto de arroz fino y 50% pasto de arroz grueso y 3) para las muestras 100% pasto de arroz grueso (porcentajes en relación masa/masa. Para este experimento se sembraron ocho réplicas de cada tratamiento para un total de 24 unidades individuales de experimentación. Estas mezclas de sustratos y granulometrías fueron seleccionadas según los resultados de la sección previa y se realizaron con el fin de medir el efecto de estos dos factores en las propiedades físico-mecánicas del material obtenido.

La cantidad de sustrato húmedo utilizado en cada muestra fue de aproximadamente 300 g, medidos con balanza electrónica. La siembra con el hongo consistió en incorporar 60 g de inóculo de hongo ostra certificado (micelio de *Pleurotus ostreatus* PL1), equivalente a un 20% del peso húmedo del sustrato en un beaker de 300 mL. La mezcla fue agitada manualmente en el beaker para homogenizarla y distribuir el inóculo en todo el sustrato. La siembra se realizó colocando la mezcla mencionada en recipientes de aluminio rectangulares de 20 x 12 cm, que funcionaron como molde para la formación del material.

El material preparado consistió en bloques de aproximadamente 2.2 mm de espesor (Figura 1) conformados por una serie de capas de la matriz sustrato-hongo separadas por mallas metálicas de dimensiones 19.5 x 9.5cm y orificios de 2 mm de diámetro. Para ello, se procedió a la colocación de una capa de 0.4 cm de matriz sustrato-hongo en el recipiente, sobre la cual se colocó una malla. Tras ello, se colocó una capa de 0.7 cm de matriz sustrato-hongo y una malla metálica, otra capa de 0.7 cm de matriz sustrato-hongo. Finalmente se colocó una malla metálica y una última capa de 0.4 cm de matriz sustrato-hongo. El bloque de un espesor aproximado de 2.2cm, se compactó ejerciendo una presión uniforme y distribuida en toda el área con un peso de 1 kg sobre la parte superior por un

tiempo de 1 minuto con el fin de eliminar espacios vacíos entre las partículas, con lo que se logró disminuir el espesor a un promedio de 2 cm. Las muestras fueron introducidas en bolsas de polipropileno que se cerraron y posteriormente fueron colocadas dentro de una incubadora marca Hotec, modelo 624HD a 25°C y 80% HR. Las muestras se humedecieron con un atomizador por un periodo de 15 días usando 10 ml de agua destilada cada 3 días. A los 15 días de la inoculación inicial, se procedió a sacar el molde de las bolsas y las muestras se colocaron en la incubadora por 18 días más, humedeciendo el material cada 3 días con 10 ml de agua destilada por muestra con el atomizador asegurando cubrir toda el área.



Figura 5. Muestra visual del bloque de material preparado en este estudio mostrando sus dimensiones. A) Vista superior B) Vista lateral

El tiempo total de incubación fue de 33 días hasta que el micelio cubrió por completo el sustrato. Al cabo de 33 días se procedió a deshidratar el material con el fin de detener el crecimiento del hongo en un horno marca Digisystem Laboratory Instruments Inc. Modelo DSO-3000DF a 60°C por 24 h.

2.3 PRUEBAS DEL MATERIAL OBTENIDO

Los materiales obtenidos de la sección anterior se caracterizaron con pruebas de flexión y densidad en el laboratorio de estructuras del Laboratorio Nacional de Materiales y Modelos Estructurales (LANAMME) de la Universidad de Costa Rica, el cual es un laboratorio acreditado por el Ente Costarricense de Acreditación (ECA). Estos materiales se muestran en la Figura 6.

Las pruebas se llevaron a cabo de acuerdo con los métodos de las normas ASTM C303-10 y C203-05 para la determinación de las dimensiones y densidad de aislamientos térmicos de tipo bloque y tableros preformados y para la determinación de cargas de ruptura y propiedades de flexión de aislamientos térmicos de tipo bloque, respectivamente. Dado que ambas normas se utilizan para la medición de propiedades a flexión del poliestireno expandido y a que el material desarrollado presenta cierta similitud con este polímero, se realiza también una comparación de las propiedades medidas en relación con este material.



Figura 6. Apariencia visual de los tres tipos de bloque preparados en el estudio.

A) 50% pasto grueso, 50% bagazo fino

B) 50% pasto grueso 50% pasto fino

C) 100% pasto grueso

Fecha: 01/10/2018

Medición de densidad

Para la medición de la densidad, lo primero que se hizo fue estandarizar las dimensiones de las muestras, cortando cuatro de sus caras con una sierra de cinta para madera (dos cortes a lo ancho y dos a lo largo) hasta obtener superficies más homogéneas sobre las cuales realizar la medición de las dimensiones; este proceso no generó ningún daño evidente en el material al realizar el corte a la malla metálica. Según la norma C303-10, es posible llevar a cabo un proceso de secado previo a la medición de la densidad con el fin de eliminar la

humedad remanente en el material, sin embargo, este proceso de secado no se realizó debido a que las muestras fueron procesadas inmediatamente después de haberse llevado a cabo el proceso final de deshidratación para la obtención del material.

Para la medición de las dimensiones se utilizó un vernier de 300 mm, y se realizaron dos mediciones de longitud, dos del ancho y cuatro del espesor. Este proceso se hizo sin deformación en el material y para la medición de la masa se utilizó una balanza electrónica marca Precisa, modelo 1000c-3000d.

Medición de propiedades a flexión

El equipo utilizado para las pruebas de flexión fue de la marca MTS Landmark, modelo Servohydraulic Test System de 25 kN. Esta prueba se realizó según un protocolo diseñado para materiales que fallan a pequeñas deflexiones. Para ello, el material a evaluar se colocó sobre dos soportes paralelos y se ejerció fuerza perpendicular al mismo a una distancia media entre los soportes, con una cruceta (Figura 3).

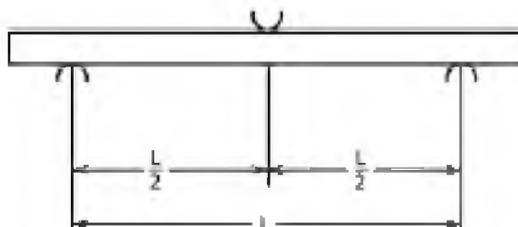


Figura 7. Diagrama de método utilizado para las pruebas de flexión. Fuente: (15)

Según la norma C203-05, este método funciona para la medición del módulo de ruptura y carga de ruptura, los cuales son útiles para inspección del control de calidad y para fines de especificaciones del material (15).

La distancia entre los soportes se determinó cumpliendo las siguientes relaciones:

$$20 \geq L/d \geq 2 \quad (A)$$

$$\frac{L}{b} \geq 0.8 \quad (B)$$

$$\frac{b}{d} \geq 1 \quad (C)$$

En (A), L es la distancia entre los soportes (valor inicial de 125 mm) y d es el espesor de la muestra (20 mm como promedio). Con estos valores el resultado de la relación es de 6.25 que cumple con la desigualdad dada. En (B), b corresponde al ancho promedio de las muestras (99 mm), y L es 125 mm, por lo que el valor de dicho cociente es de 1.26, y se cumple la relación dada. Finalmente, en (C), b corresponde al ancho promedio de las muestras (99 mm), y d al espesor promedio de las muestras (20 mm). Con estos valores el cociente es de 4.95, y se cumple la relación dada.

Luego, se determinó también la velocidad requerida de aplicación de la fuerza por parte de la cruceta. Para lo anterior se usó la ecuación 1:

$$R = \frac{Z * L^2}{6 * d} \quad (1)$$

Donde:

R: velocidad de la cruceta (mm/min),

L: distancia entre soportes (mm),

d: espesor de la muestra (mm), y

Z: tasa de deformación de la fibra exterior (mm/mm*min); debe ser igual a 0.01.

Sustituyendo términos y utilizando un espesor de muestra promedio real calculado de 19.3 mm se obtuvo:

$$R = \frac{0.01 * 125^2}{6 * 19.3} = 1.35 \text{ mm/min}$$

Se determinó que el ensayo debía detenerse si la máxima deformación unitaria en las fibras exteriores alcanzaba el valor de 0.05 mm/mm, por lo que la deflexión máxima permitida en el centro de la muestra se calculó con:

$$D = \frac{\varepsilon * L^2}{6 * d} \quad (2)$$

Donde:

D: deflexión en el centro de la muestra (mm),

d: espesor de la muestra (mm),

ε: deformación unitaria (mm/mm) 0.05 mm/mm en este caso, y

L: distancia entre los soportes (mm).

De manera que, sustituyendo los valores, se obtiene:

$$D = \frac{0.05 * 125^2}{6 * 19.3} = 6.75 \text{ mm}$$

De esta forma, una deflexión en el centro de la muestra de 6.75 mm fue utilizada para todas las muestras.

De manera similar al procedimiento anterior, para cada una de las muestras se calculó el esfuerzo máximo de las fibras por medio de:

$$S = \frac{3 * P * L}{2 * b * d^2} \quad (3)$$

Donde:

P: carga en algún punto dado de la curva fuerza-deformación (N),

L: distancia entre los soportes (mm),

b: ancho de la muestra (mm),

d: espesor de la muestra (mm), y

S: esfuerzo en las fibras (MPa).

El máximo esfuerzo en las fibras mide la resistencia a la flexión en las fibras del material. Por ejemplo, para el poliestireno expandido, los valores para este parámetro rondan entre 0.172 MPa y 0.52 MPa, dependiendo de la densidad y tipo (16).

Dado que la mayoría de los diagramas de fuerza-deformación mostraron linealidad, resultó adecuado tomar como P, la fuerza máxima aplicada sobre la muestra.

Así, se recalcula la máxima deformación en las fibras para corroborar que se cumpla una deformación unitaria de 0.05 mm/mm con:

$$\varepsilon = \frac{6 * D * d}{L^2} \quad (4)$$

Donde:

€: máxima deformación de las fibras o deformación unitaria (mm/mm),

D: deflexión en el centro de la muestra (mm),

d: espesor de la muestra (mm), y

L: distancia entre los soportes (mm).

El momento de inercia para cada muestra se calculó con:

$$I = \frac{b * d^3}{12} \quad (5)$$

Donde:

I: momento de inercia (mm^4),

b: ancho de la muestra (mm), y

d: espesor de la muestra (mm).

Finalmente se determinó el módulo elástico con:

$$E = \frac{P * L^3}{48 * I * D} \quad (6)$$

El módulo de elasticidad o de Young representa la proporción inicial recta del diagrama de esfuerzo-deformación unitaria, hasta el límite de proporcionalidad. Esta propiedad mecánica indica la rigidez de un material, por lo que materiales muy rígidos como el acero, llegan a tener módulos elásticos de hasta 200 GPa, mientras que materiales como el hule vulcanizado, puede llegar a tener módulos elásticos de 0.70 MPa (17).

Los datos finales fueron procesados por medio del programa estadístico Past, versión 3.21 (18). Tras estudio de la normalidad de los datos con la prueba de Shapiro-Wilk y un α de 0.05, se escogió analizar las diferencias en los valores físico-mecánicos obtenidos por medio de pruebas de t de Student, que son útiles para medir las diferencias entre dos muestras independientes y pequeñas con distribución normal y homogeneidad en sus varianzas. También se calcularon los coeficientes de variación, y se compararon los valores de densidad, esfuerzo en las fibras y el módulo de elasticidad entre los materiales desarrollados y los valores medios reportados para poliestireno expandido, dado que este

último presenta semejanzas texturales y estructurales similares al material biológico desarrollado según criterio experto del jefe del laboratorio de estructuras del LANAMME.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Pruebas preliminares

Según los resultados obtenidos de las pruebas preliminares realizadas, la colonización fue deficiente en algunos sustratos como teca, roble coral y guanacaste blanco. Posibles factores como la composición química del sustrato, por ejemplo, presencia natural de resinas en el aserrín de algunas de las maderas mencionadas, pudieron haber afectado el crecimiento micelial, dando como resultado una baja rapidez y uniformidad de colonización y una consistencia al tacto poco favorable. Por otro lado, la presencia de agroquímicos como los fungicidas de efecto residual, aplicados en campo, pudo haber afectado parcial o totalmente la colonización del hongo en sustratos como el raquis de banano, en el cual hubo un crecimiento nulo por parte del hongo.

La contaminación con *Trichoderma spp.* en la totalidad de las muestras sembradas en sustratos como la granza de arroz fue común, a pesar de que el material fue esterilizado previamente bajo las mismas condiciones de temperatura y tiempo que el resto de los sustratos, sin embargo, en este caso, es posible que, por las características anatómicas de este material, no se lograra destruir las esporas de los hongos contaminantes.

Por su parte, algunos sustratos como por ejemplo el pino, presentaron una rapidez y uniformidad de crecimiento medio y una consistencia al tacto relativamente buena por lo que en un inicio fue considerado para ser utilizado en las pruebas finales.

Uno de los sustratos que presentó una colonización muy buena, fue el aserrín de guapinol, en el cual el hongo se logró desarrollar rápida y uniformemente. Al igual que en el guapinol, el bagazo y el pasto de arroz presentaron resultados buenos en cuanto a rapidez y uniformidad de colonización, como también una buena consistencia al tacto. Estos al ser su

producción bastante común y distribuida en diversas partes del país, fueron los sustratos escogidos para la realización de las pruebas finales, descartándose entonces la utilización de los aserrines de pino y guapinol.



Figura 8. Diferencias visuales en el crecimiento micelial entre muestras desarrolladas.

Las posibles razones por las cuales el hongo presentó una deficiente rapidez y uniformidad de colonización, como también una consistencia al tacto poco favorable en algunos sustratos, pueden ser diversas, sin embargo dentro de las principales cabe mencionar la composición química o ultraestructural de los componentes primarios de estos sustratos y las características anatómicas de los mismos, no así el proceso de elaboración como tal, puesto que todos los sustratos fueron manejados en las mismas condiciones.

De esta forma, el procedimiento desarrollado para el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* se basó en el utilizado para la producción de hongo para consumo como alimento, debido a que cuenta con los procesos de esterilización de sustrato, inoculación e incubación, bajo los cuales es posible promover la colonización del sustrato por parte del micelio. Este procedimiento presentó limitaciones, dado que es necesario proveer las condiciones necesarias al hongo para su desarrollo (inocuidad, temperatura y humedad), lo que está estrechamente relacionado a estado y calibración de los equipos de laboratorio, que

en muchas ocasiones se encontraban sucios, herrumbrados o su diseño no permitía llevar a cabo el proceso bajo la inocuidad necesaria o se tenía incertidumbre sobre los parámetros de temperatura y humedad relativa provistos por el equipo a lo largo del proceso de incubación. Por otro lado, cabe mencionar que debido a que en algunos laboratorios se tiende a trabajar con una amplia variedad de microorganismos como bacterias y otras especies de hongos, la contaminación del sustrato durante el proceso de siembra es posible, por más que se realice una desinfección de dichos equipos.

Debe además considerarse que la variación mínima en algún parámetro del proceso (temperatura o humedad relativa) puede acarrear un cambio drástico en los resultados de rapidez y uniformidad de colonización, como también en la consistencia al tacto, lo que a su vez evidencia la complejidad de trabajar con organismos vivos que dependen enormemente de condiciones específicas para el desarrollo de materiales biológicos de este tipo.

Tras todas estas consideraciones se logró desarrollar el protocolo de construcción del material biológico en cuestión. Este protocolo está implícitamente explicado en la metodología de la sección sobre pruebas finales incluida en este documento.

3.2 Pruebas finales

De los tres tipos de bloque construidos, únicamente aquellos desarrollado con mezcla de 50% pasto de arroz grueso y 50% bagazo fino y los desarrollado con mezcla de 50% pasto de arroz grueso y 50% pasto de arroz fino resultaron adecuados para el análisis mecánico. Los bloques desarrollados con 100% pasto de arroz grueso no se desarrollaron adecuadamente, y se adhirieron a los moldes, por lo que tuvieron que ser descartados del análisis. Además de ello, una muestra experimental de cada uno de los tratamientos experimentales no descartados, resultaron dañadas y debieron exceptuarse del análisis, dando como resultado el análisis de un total de 14 muestras.

Al analizar las propiedades físico-mecánicas de los materiales construidos se encontró que la máxima densidad fue registrada para el material elaborado con una mezcla de 50% pasto

fino con 50% pasto grueso (ver Cuadro 1). Lo anterior fue registrado a pesar de que las dimensiones de las muestras evaluadas fueron un poco (pero no significativamente) menores. Cuando se analizó el valor de densidad para cada uno de los materiales, se observó que el promedio para el material desarrollado con una mezcla de 50% bagazo fino con 50% pasto grueso fue un 16% menor con respecto al promedio para el material desarrollado con una mezcla de 50% pasto fino con 50% pasto grueso, lo que se asocia directamente a la densidad del sustrato, ya que el pasto de arroz es más denso que el bagazo.

Cuadro 5. Valores promedio asociados con las variables registradas para medir densidad del material en el estudio presente. Las desviaciones estándar se muestran entre paréntesis.

Tipo de material	Longitud (cm)	Ancho (cm)	Espesor (cm)	Masa (g)	Densidad (kg/m³)
Tipo 1	204.6 (0.8)	98.0 (1.0)	20.0 (0.6)	45.9 (1.6)	114.5 (2.2)
Tipo 2	203.1 (2.3)	96.4 (0.9)	18.6 (0.6)	48.3 (1.5)	132.7 (2.2)

Nota: Material Tipo 1 se refiere al desarrollado con una mezcla de 50% bagazo fino y 50% pasto de arroz grueso, material Tipo 2 se refiere al desarrollado con una mezcla 50% pasto de arroz fino y 50% pasto de arroz grueso.

El promedio de la densidad de ambos tipos de material es mayor que el reportado para el poliestireno expandido, del cual se registran valores entre 16 y 48 kg/m³ (ver (16) y (17)) dependiendo de su tipo y composición.

En materiales biológicos como la madera, la densidad tiene una relación directamente proporcional con su resistencia mecánica (19), por lo que lo más esperado con los resultados obtenidos es que los bloques de material biológico desarrollados al ser más densos deberían presentar características mecánicas mejores que las del poliestireno expandido. Por otro lado, algunas investigaciones han encontrado que en materiales como el plywood el cual se compone de partículas conglomeradas de madera, existe una correlación similar entre la densidad y la resistencia a flexión perpendicular (20). Esta

misma relación se debió haber cumplido de haber existido una mejor colonización del hongo en el sustrato, aspecto que se muestra más adelante.

Cuando se hicieron las pruebas de flexión, se observó que el máximo esfuerzo de flexión en las fibras fue registrado para el material desarrollado con una mezcla de 50% pasto grueso y 50% bagazo fino. Es interesante analizar que para el poliestireno expandido, se han registrado valores de módulo de elasticidad entre 1.24 y 3.45 MPa, para las densidades reportadas y cumpliéndose una relación directa de proporcionalidad entre la densidad y la resistencia a la flexión (16). Los valores del módulo elástico registrados en los materiales contruidos en este estudio estuvieron dentro del rango registrado para el poliestireno expandido. Sin embargo, al analizar tanto el valor del módulo elástico como el de densidad, se puede observar que los materiales creados en este estudio tienen alta flexibilidad para la densidad medida; en otras palabras, son materiales densos y moderadamente flexibles.

En esta investigación no se pudo determinar si la utilización de la malla metálica tuvo algún efecto positivo o negativo en el desarrollo del material y por consiguiente de las propiedades mecánicas de este, de modo que es crucial realizar una comparación de dichas propiedades, entre muestras que no contengan ningún tipo de malla o elemento, con muestras que contengan otros componentes estructurales internos como refuerzos longitudinales de distintos materiales y calibres, o número de capas o unidades de refuerzo. Esto con el fin de comparar el crecimiento del hongo y la resistencia a la flexión o compresión del material, la cual podría ser mayor o menor y que por lo tanto deberían implementarse de acuerdo con la aplicación que se le quiera dar al material.

Cuadro 6. Valores promedio asociados con las variables registradas para medir flexión del material en el estudio presente. Las desviaciones estándar se muestran entre paréntesis.

Tipo de material	Máximo esfuerzo en las fibras (MPa)	Módulo elástico (MPa)
Tipo 1	0.08 (0.01)	1.54 (0.23)
Tipo 2	0.07 (0.01)	1.31 (0.23)

Nota: Material Tipo 1 se refiere al desarrollado con una mezcla de 50% bagazo fino y 50% pasto de arroz grueso, material Tipo 2 se refiere al desarrollado con una mezcla de 50% pasto de arroz fino y 50% pasto de arroz grueso.

3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Densidad

Al analizar estadísticamente los valores asociados con las pruebas realizadas a los dos tipos de material construido, se encontraron diferencias significativas entre la densidad de los dos tipos de materiales construidos ($t=15.293$, $P<0.05$), siendo mayor la densidad de las muestras desarrolladas con mezcla de 50% pasto de arroz grueso y 50% pasto de arroz fino. El coeficiente de variación para la densidad de los materiales fue de 1.93 para el material desarrollado con mezcla de 50% pasto de arroz grueso y 50% bagazo fino y de 1.67 para el material desarrollado con mezcla de 50% pasto de arroz grueso y 50% pasto de arroz fino, criterio que muestra baja variabilidad en los datos de densidad medidos. Al realizar la comparación entre los dos materiales desarrollados y la densidad del poliestireno expandido tipo I, se encontró que existen diferencias estadísticamente significativas en ambos tipos de muestras, siendo mayor la densidad de ambos materiales construidos ($t=119.6$, $P<0.05$ y $t=140.9$, $P<0.05$ para la comparación material tipo 1-poliestireno y material tipo 2-poliestireno, respectivamente).

Esfuerzo máximo en las fibras

Se encontraron diferencias significativas para el esfuerzo máximo en las fibras de los materiales ($t=2.249$, $p<0.05$), siendo mayor este parámetro en el material desarrollado con mezcla de 50% pasto de arroz grueso y 50% bagazo fino. En este caso, el coeficiente de variación fue de 12.6 para el material desarrollado con mezcla de 50% pasto de arroz grueso y 50% bagazo fino y de 17.3 para el material desarrollado con mezcla de 50% pasto de arroz grueso y 50% pasto de arroz fino. Al realizar la comparación entre el esfuerzo máximo a la flexión en las fibras de los dos materiales desarrollados y la del poliestireno expandido tipo I, se encontró que existen diferencias estadísticamente significativas en el

esfuerzo de flexión en ambos tipos de muestras, siendo mayor el esfuerzo a la flexión en el poliestireno expandido ($t=-28.62$, $P<0.05$ y $t=28.03$, $P<0.05$ para la comparación material tipo 1-poliestireno y material tipo 2-poliestireno, respectivamente).

Módulo de elasticidad

Se encontró que no existen diferencias significativas entre los valores de módulo de elasticidad de los dos tipos de materiales construidos ($t=1.8796$, $p >0.05$). El coeficiente de variación fue de 14.73 para el material desarrollado con mezcla de 50% pasto de arroz grueso y 50% bagazo fino y de 17.3 para el material desarrollado con mezcla de 50% pasto de arroz grueso y 50% pasto de arroz fino, mostrando también gran variabilidad en los datos obtenidos.

Al realizar la comparación entre el módulo de elasticidad de cada uno de los materiales desarrollados y la del poliestireno expandido tipo I, se encontró que no existen diferencias estadísticamente significativas en este parámetro.

Dado que los ensayos se llevaron a cabo utilizando inóculo de hongo *Pleurotus ostreatus*, y que no existió variación en la composición química de los sustratos utilizados a lo largo de las pruebas finales de la investigación, los principales factores a los cuales se les atribuye la alta variabilidad en los datos de máximo esfuerzo a la flexión y módulo elástico fueron el manejo del proceso (tipo de molde, mallas utilizadas) y los parámetros de ambiente controlado (temperatura y humedad relativa).

Dados los resultados obtenidos de las pruebas físico-mecánicas realizadas, se pudo caracterizar el material obtenido como un material de densidad más alta que la del poliestireno expandido y resistencia a la flexión más baja que este último, lo que indica una aptitud de este material para ser utilizado en aplicaciones donde no se requiera del soporte de altas cargas de flexión.

Además del potencial de este material como alternativa estructural en diversas aplicaciones, cabe rescatar el potencial beneficio ambiental que conllevaría la fabricación a gran escala

de este tipo de materiales que en primera instancia ayudaría a reducir los riesgos de incidencia de plagas en cultivos y animales por la disminución de residuos sin tratar. Además, se podría dar un valor agregado a estos residuos, siendo una potencial nueva actividad económica en regiones rurales donde la agricultura y por tanto los residuos resultantes de esta, son abundantes. Otro gran beneficio de la fabricación de estos materiales sería la reducción del consumo de materiales sintéticos como el plástico o el poliestireno expandido que tienen una alta huella ambiental, tanto en su fabricación, como para su disposición final.

4 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

1. Se logró crear un protocolo de construcción de un material biológico a partir de desechos agroindustriales y el hongo ostra. Este protocolo fue evaluado efectivamente durante la fase preliminar de trabajo, que además incluyó la selección de los sustratos para la fase final.
2. Este tipo de investigación, en la cual existe un microorganismo involucrado en el proceso, resulta sumamente compleja pues existen gran cantidad de factores que influyen en el crecimiento del hongo, por lo que debe existir un control más riguroso de los distintos parámetros (temperatura, humedad relativa, inocuidad de equipos).
3. El hongo no colonizó adecuadamente el sustrato en las pruebas finales, afectando directamente las propiedades mecánicas del material resultante. A pesar de que no se obtuvieron los resultados deseados, en pruebas de siembra previas, se logró observar una mejor colonización por parte del hongo y por consiguiente una mejor conformación del material, de modo que no se debe descartar que la calidad del material creado pueda ser mejor que la analizada en este estudio.
4. La utilización de los moldes metálicos pudo haber afectado el crecimiento y desarrollo del hongo por varias razones, dentro de la cuales el tipo de material, su maleabilidad,

la adherencia del sustrato a las paredes, la falta de contacto del contorno de la muestra con aire, y los factores de manejo, pueden ser las más importantes.

5. Se observaron diferencias significativas en la densidad de los dos tipos de muestra, siendo las muestras tipo 2 las más densas, mientras que, al comparar este parámetro con los valores reportados para el poliestireno expandido tipo I, la densidad de este último es menor que la de las dos muestras experimentales.
6. Se observaron diferencias significativas en el esfuerzo de flexión de los dos tipos de muestra, siendo las muestras tipo 1 las que presentaron los valores más altos. Estas diferencias significativas se mantuvieron al comparar los valores de este parámetro en los materiales creados y el esfuerzo de flexión del poliestireno expandido tipo I, el cual es mayor que los dos materiales experimentales.
7. No se registraron diferencias significativas en el módulo de elasticidad de los dos tipos de muestra, ni entre los valores de dichas muestras y el reportado para el poliestireno expandido.
8. Las muestras tipo 1 fueron las menos densas y las que presentaron mayores esfuerzos de flexión en comparación con las muestras tipo 2, por lo que resultaron estructuralmente más resistentes a la flexión y más livianas.
9. Debido a su baja resistencia a la flexión, las posibles aplicaciones de este material en la ingeniería no deberían ser de tipo estructural, pero podrían ser útiles como aislamientos térmicos y acústicos o en la fabricación de material para embalaje o vajillas desechables.
10. En síntesis, es posible llevar a cabo la creación de materiales biológicos a partir de desechos agroindustriales y del hongo *Pleurotus ostreatus*, sin embargo, la obtención de buenos resultados está directamente relacionada a un control estricto de los parámetros que afectan el crecimiento de este organismo, las condiciones de los equipos y la asepsia que exista en estos, como también el aseo de las personas que manipulan, equipos, utensilios y materia prima. Otro factor que efectivamente afecta es el tipo de sustrato y granulometría, por lo que es necesario optimizar las

combinaciones de estos factores tal que se llegue a obtener las mejores propiedades físico-mecánicas posibles.

11. La fabricación a gran escala de este tipo de materiales representaría un aporte considerable en cuanto al compromiso mundial de reducción de la huella de carbono en la actividad industrial, pues no solo se pueden obtener materiales cuyas propiedades son favorables, sino que también esta tecnología representa una salida viable para aportar en el objetivo país de obtención de la carbono neutralidad.

4.2 RECOMENDACIONES

1. Es recomendable utilizar moldes de materiales antiadherentes, autoclavables, reutilizables y con agujeros o de pared porosa, por donde la muestra pueda tener contacto con el ambiente de la incubadora.
2. Es recomendable investigar el efecto de la utilización de otros residuos agrícolas como lo son el rastrojo de piña, y la broza de café, así como otros aserrines de maderas comunes o en su defecto mezclas de distintos sustratos. También resulta importante estudiar distintas especies de hongos, pues ellas podrían ofrecer otras propiedades de interés a los materiales.
3. Se debe estudiar las propiedades térmicas del material creado con el protocolo acá utilizado. Algunas de ellas, como la conductividad térmica y el calor específico pueden ofrecer ventajas comparativas con respecto a un material como el poliestireno expandido el cual es inflamable y emana gran cantidad de gases contaminantes cuando se quema. En pruebas preliminares los materiales creados acá no mostraron flamabilidad, presentaron una mayor resistencia ante el fuego (21). De igual forma, las propiedades de comportamiento a la compresión y de aislamiento acústico deberían de ser estudiadas en los materiales creados en este estudio.
4. Es necesario estudiar el efecto de la malla metálica sobre las propiedades mecánicas del material creado, así como la utilización de otro tipo de refuerzos, que ofrezcan opciones de modificación de propiedades.

5. Resulta necesario reconocer la trazabilidad de los sustratos utilizados, pues se debe evitar que tengan residuos de plaguicidas o fungicidas, los cuales pueden afectar el crecimiento del hongo de forma parcial o total y por consiguiente repercutir en las propiedades del material resultante.
6. Finalmente, un parámetro que podría ser interesante de controlar sería el CO₂ en la cámara de incubación, por lo que un estudio de crecimiento a distintas concentraciones de este gas podría ser de bastante utilidad, para optimizar el proceso de crecimiento.
7. Es recomendable utilizar equipos fiables, de manera que se pueda garantizar las condiciones de temperatura y humedad relativa constantes a las muestras.

5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anderson CE. Potential of *Pleurotus ostreatus* to remediate diesel-contaminated soil in subarctic mesocosms (Tesis de Maestría). University of Alaska Fairbanks; 2016.
2. Rodríguez Rosario KJ. Eficacia del hongo *Pleurotus ostreatus* como biorremediador de suelos contaminados con metales pesados (Tesis de Maestría). Universidad de Puerto Rico. 2005;83.
3. Enriquez F, Camarillo D, Loera O, González I, Chan W, Odín C. Estudio de la correlación entre actividades enzimáticas de lacasa y manganeso peroxidasa con la remoción de fármacos. Presentado en 2º Congreso Nacional AMICA; Octubre 21-23 2015. Puebla, México.
4. Rodríguez A, Rodríguez Y. Biodegradación de poliuretano mediante el uso del hongo *Pestalotiopsis microspora*. [Internet]. Barrancabermeja: Escuela de Ingeniería Ambiental; 2015 [citado el 29 de Jul 2018] disponible en: <https://bit.ly/2PqbI95>
5. INEC. Censo Agropecuario 2014: Total de fincas con actividad agrícola por principal tipo de tratamiento de residuos, según provincia y tamaño de la finca en hectáreas. San José; 2014.
6. Singh VP. Climate change. In: Singh VP, editor. Handbook of Applied Hydrology, Segunda edición. Nueva York; McGraw Hill Professional, 2017.
7. Armstrong S, Liaw J. Fundamentals of the fungi. Mycologia. 1972;64(6):1364-1365.
8. Bartnicki-Garcia S. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. Annual Reviews of Microbiology. 1968;22(1):87-108.

9. Miles GP, Chang S-T. *Pleurotus* - a mushroom of broad adaptability. *Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact*. Boca Raton, Florida: CRC Press; 2004. 315-325.
10. Dharmesh Gupta S, Reena Chandel K, Kapoor S. Technology of mushroom production and its postharvest technology. *Indigenous Fermented Foods of South Asia*. Boca Raton, Florida: CRC Press; 2016. p. 717-722.
11. Coello J. Aplicación del hongo *Pleurotus ostreatus* como alternativa para la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados (Tesis de licenciatura). Escuela Superior Politécnica del Litoral; 2011.
12. Donado Parada T. Evaluación de tres sustratos para la producción de hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*). Universidad Rafael Landívar; 2014.
13. Diamantopoulou PA, Philippoussis AN. Cultivated mushrooms: preservation and processing. En: Hui YH, Özgül Evranuz E, editores. *Handbook of Vegetable Preservation and Processing*. Boca Raton, Florida: CRC Press; 2014. 495-517
14. Hernandez RA, Lopez CL. Evaluación del crecimiento y producción de *Pleurotus ostreatus* sobre diferentes residuos agroindustriales del departamento de cundinamarca (Tesis de licenciatura). Pontificia Universidad Javeriana; 2008
15. ASTM (American Standard Test Materials) C 203 – 99. Standard test methods for breaking load and flexural properties of block-type thermal insulation. 1999; (Reaprovado en 2017):3-8.
16. Dyplast. EPS Insulation data sheet. Miami; 2017.
17. Hibbeler RC. *Mecánica de Materiales*. 6th ed. Mexico: Prentice Hall; 2006. 94-95.
18. Hammer O, Harper DA., Ryan PD. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*; 2001.
19. Sccarello MV. *La madera desde su conocimiento hasta su conservación*. Bolivia: Editorial Gente Común; 2010. 41 p.
20. Tenorio C, Moya R, Camacho D. Propiedades físico-mecánicas de tableros terciados construidos con especies tropicales de plantaciones para uso estructural. *CERNE [Internet]*. junio de 2012;18(2):317-25. Recuperado a partir de: <https://bit.ly/2AyjIv4>
21. Mayoral E. Growing architecture through mycelium and agricultural waste. *The International Journal of the Constructed Environment*. 2011;1(4): 87-132.

CAPÍTULO 3. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. Se pudo diseñar un protocolo para la elaboración de un material biológico producido a partir del hongo *Pleurotus ostreatus*. Este se basó en el procedimiento utilizado para la producción de hongo ostra para consumo alimenticio y se hicieron las adaptaciones respectivas que dieron pie a la obtención de un material que podría surgir como una alternativa a materiales comunes como el poliestireno expandido, utilizado en cientos de aplicaciones de ingeniería.
2. Se evaluó el crecimiento micelial en distintos sustratos base y granulometrías, encontrándose un buen desempeño y crecimiento del hongo en guapinol, bagazo y pasto de arroz, no así en distintos sustratos como raquis de banano, granza de arroz, aserrín de roble coral, teca y guanacaste blanco, los cuales tuvieron un crecimiento micelial deficiente.
3. Se logró identificar las prácticas más comunes de tratamiento de residuos agrícolas orgánicos en fincas de todo el país, encontrándose que en muchas de estas no se les da un tratamiento a los residuos de la cosecha y poscosecha, pudiéndose utilizar estos en la producción de materiales biológicos, cuya fabricación es amigable con el ambiente y cuya disposición al ambiente tras su utilización, a diferencia de muchos de los materiales utilizados hoy día, no genera impacto en este.
4. El desarrollo de los materiales biológicos podría eventualmente surgir como una quinta revolución industrial, impulsada por la necesidad de implementar materiales y tecnologías más amigables con el ambiente. Estas pueden ofrecer igual o mejores propiedades (físico-estructurales, de aislamiento térmico-acústico) que las que los materiales comunes ofrecen, en beneficio de la industria y en aras de aportar soluciones en cuanto al tema de mitigación y adaptación al cambio climático.
5. El involucramiento de organismos vivos en estudios de este tipo origina gran sensibilidad, pues una variación en algún parámetro puede significar un cambio drástico en los resultados. Esta fue la razón principal por la cual el presente

proyecto requirió de mucho trabajo para estandarizar el procedimiento, escoger los sustratos más adecuados y optimizar los parámetros de manejo.

6. Resulta interesante realizar pruebas en algunos de los residuos agrícolas orgánicos de mayor disponibilidad en la matriz de RAO en Costa Rica, tanto en los resultantes de la cosecha como por ejemplo el rastrojo generado por la actividad piñera, principal actividad agrícola en Costa Rica hoy día, como también en otros subproductos de la postcosecha como por ejemplo la pulpa del café y los residuos de la actividad de extracción de aceite de palma. Resultaría no menos importante incluir la investigación con residuos del aserrío de las maderas más explotadas en el país, sin embargo, es importante que estos aserrines sean puros y no se encuentren mezclados con otros de otras maderas, pues esto puede afectar los resultados.
7. Dado que la gama de especies de hongos es verdaderamente amplia, surge la necesidad de investigar la utilización de algunas otras especies de estos organismos en la producción de materiales biológicos (como por ejemplo *Ganoderma lucidum*, con el cual ya se han desarrollado diversos estudios), en búsqueda de las propiedades deseadas según el tipo de aplicación.
8. Es recomendable realizar ciertas pruebas a fin de mejorar los resultados obtenidos, como por ejemplo aplicando algún tipo de aglutinante como goma xantán o almidón, de modo que estos proporcionen cohesión a las partículas de sustrato y por lo tanto del material biológico resultante. Además, resultaría interesante estudiar el efecto de distintos componentes dentro del material como por ejemplo la utilización de otro tipo de malla, ya sea metálica, de madera o de algún otro material que le provea rigidez.
9. Es necesario tomar en cuenta que, aunque la implementación de esta tecnología no requiere de muchos equipos, sí se requiere manejar condiciones sumamente asépticas a fin de disminuir la posibilidad de contaminación del material con otros hongos o bacterias. Los equipos deben ser de fácil lavado y desinfección, para reducir el riesgo de contaminación cruzada. Así mismo, los parámetros de desinfección deben ser bastante estrictos y el personal o recurso humano que

manipula tanto equipos como material, debe utilizar la indumentaria como gabacha, tapabocas, cofia y guantes, similar o más estricto a lo exigido para la manipulación de alimentos. Por otro lado, es de suma importancia brindarle al hongo las condiciones de temperatura y humedad relativa requeridas, para lo cual los equipos deben estar adecuadamente calibrados y en correcto funcionamiento.

10. Los moldes donde se realiza la siembra deben ser preferiblemente de un material reutilizable, antiadherente, rígidos y lavables, por ejemplo, el acero inoxidable puede ser un material fácil de meter en autoclave para desinfectar y volver a utilizar. Preferiblemente estos moldes deben poder abrirse para retirar fácilmente el material al final del desarrollo del mismo. Estos moldes deben poseer pequeños orificios, cuyo tamaño se debe probar, para que el hongo pueda realizar un adecuado intercambio gaseoso y para que la humedad donde se incuba logre estar en contacto con todo el contorno del material inoculado, favoreciendo el desarrollo del micelio.
11. La automatización en el proceso puede ser un factor clave para mejorar los resultados obtenidos, ya que se puede realizar por ejemplo aplicaciones puntuales de agua a las muestras en incubación, sin tener que humedecer una por una. Este paso sería esencial para la replicación del proceso a escalas más grandes, permitiendo la estandarización del proceso.
12. Debe realizarse un estudio de factibilidad económica de la producción de este material biológico tomando en cuenta todos los costos asociados a su producción como acarreo de materia prima, secado, molienda y el resto del proceso, con el fin de evaluar si económicamente puede competir con la fabricación de materiales comunes. Es importante mencionar que lo ideal es que se logre utilizar la menor cantidad de recursos posibles por ejemplo en el secado del sustrato, el cual es uno de los procesos de mayor requerimiento energético, podría utilizarse un secador solar.
13. También debe llevarse a cabo un estudio de viabilidad económica de la utilización de los residuos agrícolas orgánicos y forestales en la producción de materiales

biológicos en contraste con la utilización de los mismos residuos en otras aplicaciones como compostaje, energía, alimentación animal.

14. Debe estudiarse además las implicaciones en cuanto a huella ambiental producida por la fabricación de materiales sintéticos en contraste con la huella ambiental producida por la elaboración del material biológico. Esto podría inclinar la balanza a favor de la producción de materiales biológicos pues hoy día la producción de materiales sintéticos solo contempla los costos asociados a su producción y no a las labores posteriores para procesarlo o tratarlo luego de su utilización, o simplemente tienen un efecto sobre el ambiente que debería poder cuantificarse en términos económicos para poder identificar el costo total de elaboración-tratamiento del material.
15. Debe identificarse además los nichos de mercado en los cuales el material biológico podría llegar a ser una solución a gran escala a fin de promover un beneficio ambiental prolongado y creciente. Esto debe ir acompañado de un estudio de la viabilidad de escalación del proyecto de un nivel de laboratorio a dimensiones industriales que permita competir con la fabricación de materiales comunes.
16. Según resultados cualitativos y dado que existen residuos o sustratos más difíciles de digerir que otros, es importante realizar una diferenciación en el tiempo de incubación y desarrollo de los materiales en dependencia de su composición, de manera que se permita una adecuada colonización del hongo y por consiguiente una descomposición homogénea de todo el sustrato. En el caso de este estudio, se estandarizó el proceso y se utilizó las mismas variables de temperatura, humedad relativa y tiempo de incubación a todas las muestras, sin embargo, se notó que las muestras sembradas con una mezcla de bagazo y pasto fueron colonizadas más rápida y vigorosamente que las mezclas de pasto de arroz.
17. Si bien, las muestras en las que se realizaron las pruebas no fueron colonizadas adecuadamente y por lo tanto la medición de las propiedades en el material no fue positiva, no se debe descartar o invalidar la hipótesis o la viabilidad de la investigación, pues en muestras realizadas previamente, la colonización del hongo y

por lo tanto su rigidez, fueron muy superiores, lo cual se pudo deber principalmente al espesor de las muestras, el molde utilizado, u otras variables.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Liu Z, Meyers MA, Zhang Z, Ritchie RO. Functional gradients and heterogeneities in biological materials: Design principles, functions, and bioinspired applications. *Progress in Material Science*. 2017;88:467-98.
2. Fried GH, Hademenos GJ. *Schaum's Outline of Biology*. 4a Edición. Nueva York: McGraw Hill Professional; 2013
3. Cepero MC, Restrepo S, Franco AE, Cárdenas ME, Vargas N. *Biología de Hongos*. Bogotá, Colombia: Ediciones Uniandes; 2012.
4. Donado Parada T. Evaluación de tres sustratos para la producción de hongo ostra (*Pleurotus ostreatus*) (Tesis de licenciatura). Universidad Rafael Landívar; 2014.
5. Perricone M, Gallo M, Corbo MR, Sinigaglia M, Bevilacqua A. Yeasts BT. En: Bevilacqua A, Corbo MR, Sinigaglia M, editores. *The Microbiological Quality of Food*. Amsterdam: Woodhead Publishing; 2017. 121-131.
6. Anderson CE. Potential of *Pleurotus ostreatus* to remediate diesel-contaminated soil in subarctic mesocosms (Tesis de maestría). University of Alaska Fairbanks; 2016.
7. Rodríguez Rosario KJ. Eficacia del hongo *Pleurotus ostreatus* como biorremediador de suelos contaminados con metales pesados (Tesis de maestría). Universidad de Puerto Rico. 2005.
8. Rodríguez A, Rodríguez Y. Biodegradación de poliuretano mediante el uso del hongo *Pestalotiopsis microspora*. [Internet]. Barrancabermeja: Escuela de Ingeniería Ambiental; 2015 [citado el 29 de Jul 2018] disponible en: <http://bit.ly/2PqbI959>.
9. Shrestha P. Enhanced Bioprocessing of Lignocellulose: Wood-rot Fungal

- Saccharification and Fermentation of Corn Fiber to Ethanol (Disertación). Iowa State University; 2008.
10. Adamcová D, Radziemska M, Zloch J, Vaverková MD. Removal of landfill leachate toxicity by adsorption on white rot fungi (*Pleurotus Ostreatus*). Polish Journal of Natural Science. 2017;32(4):761-770.
 11. Kerem Z, Hadar Y. Lignin-degrading fungi: mechanisms and utilization. In: Altman A, editor. Agricultural biotechnology. Nueva York: Marcel Dekker Inc; 1998. 351-360.
 12. Donnelly P, Entry J. Bioremediation of Soils with Mycorrhizal Fungi. Madison; 1999. Report No.: 37.
 13. Enriquez F, Camarillo D, Loera O, González I, Chan W, Odín C. Estudio de la correlación entre actividades enzimáticas de lacasa y manganeso peroxidasa con la remoción de fármacos. Presentado en 2º Congreso Nacional AMICA; Octubre 21-23 2015. Puebla, México.
 14. Haneef M, Ceseracciu L, Canale C, Bayer IS, Heredia-Guerrero JA, Athanassiou A. Advanced materials from fungal mycelium: fabrication and tuning of physical properties. Science Reports. 2017.
 15. Campbell N, Reece J. Biología. Madrid, España: Médica Panamérica; 2005. 608-610
 16. Cruz D, López de León E, Pascual LF, Battaglia M. Guía técnica de producción de hongos comestibles de la especie *Pleurotus ostreatus*. Journal of Agriculture and Environment for International Development. 2011;104(3/4):139-154.
 17. Vega K, Kalkum M. Chitin, chitinase responses, and invasive fungal infections. International Journal of Microbiology. 2012;1-10.
 18. Bartnicki-Garcia S. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. Annual Reviews of Microbiology. 1968;22(1):87-108.

19. Miles GP, Chang ST. *Pleurotus* - a mushroom of broad adaptability. En: Miles PG, Chang ST, editores. Mushrooms: Cultivation, Nutritional Value, Medicinal Effect, and Environmental Impact. Boca Ratón, Florida: CRC Press. 2004. 315-25.
20. Dharmesh Gupta S, Reena Chandel K, Kapoor S. Technology of mushroom production and its postharvest technology. En: Joshi VK, editor. Indigenous Fermented Foods of South Asia. Boca Raton, Florida: CRC Press; 2016. 717-722.
21. European Society for Biomaterials. Biomaterials [Internet]. 2016 [citado 22 de enero de 2017]. Recuperado a partir de: <http://www.esbiomaterials.eu>
22. Chen PY, McKittrick J, Meyers MA. Biological materials: Functional adaptations and bioinspired designs. *Progress in Material Science*. 2012;57(8):1492-1704.
23. Nawab Y, Hamdani STA, Shaker K. Structural textile design: interlacing and interlooping. Boca Raton, Florida: CRC Press; 2017. 1-13
24. Coello J. Aplicación del hongo *Pleurotus ostreatus* como alternativa para la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados (Tesis de licenciatura). Escuela Superior Politécnica del Litoral; 2011.
25. Kirk TK, Farrell RL. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. *Annual Reviews of Microbiology*; 1987;41(1):465-501.
26. Jose R, Ramakrishna S. Materials 4.0: Materials big data enabled materials discovery. *Applied Materials Today*. 2018;10:127-132.
27. Góngora Perez J. La Industria del plástico en México y el mundo. *Comercio Exterior*; 2014; 64(5):6-9.
28. Degarmo P, Black T, Kohser R. *Materiales y procesos de fabricación*. 2ª edición. Barcelona: Reverté; 1994. 251-269
29. Federación Interamericana del Cemento. Informe estadístico. Bogotá, Colombia. Federación Interamericana del Cemento; 2013.

30. Coto O. Uso de los residuos agrícolas orgánicos como fuente de energía: Aprovechamiento de recursos y reducción de gases de efecto invernadero en Costa Rica. Consultoría presentada a FITTACORI; 2013. Noviembre; San José, Costa Rica
31. INEC. Censo Agropecuario 2014: Total de fincas con actividad agrícola por principal tipo de tratamiento de residuos, según provincia y tamaño de la finca en hectáreas. San José, Costa Rica; 2014.
32. Brenes Barquero G. Cultivo de hongo ostra. 2^a edición. San José: Instituto Nacional de Aprendizaje; 2015. 2-42
33. Lopez Nava J. Desarrollo de biomateriales alternativos al poliestireno expandido a partir de hongos y cubiertas comestibles (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro; 2014.
34. Sandoval J. Proyecto eléctrico potencial de aporte en generación eléctrica en Costa Rica por parte de los ingenios azucareros mediante biomasa sustentante (Tesis de pregrado). Universidad de Costa Rica; 2014.
35. Diamantopoulou PA, Philippoussis AN. Cultivated mushrooms: preservation and processing. En: Hui YH, Özgül Evranuz E, editores. Handbook of Vegetable Preservation and Processing. Boca Ratón, Florida: CRC Press; 2014. 496-517
36. Hernandez RA, Lopez CL. Evaluación del crecimiento y producción de *Pleurotus ostreatus* sobre diferentes residuos agroindustriales del departamento de cundinamarca (Tesis de licenciatura). Pontificia Universidad Javeriana; 2008
37. Liu Z, Zhu Y, Jiao D, Weng Z, Zhang Z, Ritchie RO. Enhanced protective role in materials with gradient structural orientations: Lessons from Nature. Acta of Biomaterials. 2016;44:31-40
38. Nanni A, De Luca A, Zadeh H. Reinforced concrete with FRP bars: Mechanisms and design. Boca Ratón, Florida; CRC Press. 2014. 418 p.

39. Singh VP. In: Singh VP, editor. Climate change. Handbook of Applied Hydrology, 2a Edición. Nueva York; McGraw Hill Professional, 2017
40. Armstrong S, Liaw J. Fundamentals of the fungi. Mycologia. 1972;64(6):1364-1365
41. ASTM (American Standard Test Materials) C 203 – 99. Standard test methods for breaking load and flexural properties of block-type thermal insulation. 1999; (Reapproved 2017): 3-8
42. Dyplast. EPS Insulation data sheet [Internet]. Miami; 2017. Recuperado de <http://www.cg-eg.com/media/Products/EPS%20Data.pdf>
43. Hibbeler RC. Mecánica de Materiales. 6a edición. Mexico: Prentice Hall; 2006. 94-95
44. Hammer O, Harper DA., Ryan PD. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. Palaeontologia Electronica; 2001.
45. Sccarello MV. La madera desde su conocimiento hasta su conservación. Bolivia: Editorial Gente Común; 2010. 41
46. Tenorio C, Moya R, Camacho D. Propiedades físico-mecánicas de tableros terciados construidos con especies tropicales de plantaciones para uso estructural. 2012;18(2):317-325
47. Mayoral E. Growing architecture through mycelium and agricultural waste. The International Journal of Constructed Environment. 2011;1(4):87-132

ANEXOS

Protocolo para la elaboración de un material biológico.

Este protocolo contempla las fases y procedimientos que se deben llevar a cabo para la elaboración de un material biológico a partir del hongo *Pleurotus ostreatus* y diversos sustratos o residuos agrícolas y forestales, con fines de utilización en diversas aplicaciones de ingeniería.

Fase I: Selección de sustratos y parámetros

Esta fase consiste en la selección de diversos sustratos a través de pruebas preliminares según algunos criterios logísticos como disponibilidad, acceso al material y costo de adquisición, y a otros criterios técnicos como rapidez, uniformidad de colonización por parte del hongo y consistencia al tacto del material resultante. Según observación de estos últimos tres parámetros, se estandariza los parámetros de ambiente controlado de incubación como lo son la temperatura, que en este caso fue de 25°C, la humedad relativa, que fue de 80% y el tiempo de incubación del sustrato inoculado que fue de 30 días, aunque puede incorporarse también un control de la concentración de CO₂. Se evalúa la proporción de inóculo con respecto al sustrato húmedo, que en este caso se utilizó 20% del peso húmedo de sustrato en inóculo, la utilización de un recipiente-molde, y la utilización de elementos de refuerzo como mallas, varillas, alambres u otras.

Fase II: Prueba de granulometrías y métodos de siembra

Esta fase consiste en evaluar el efecto de las distintas granulometrías de los sustratos seleccionados en la fase anterior y con los parámetros de ambiente controlado establecidos. Se realizan al menos tres tipos de muestras o combinaciones de sustratos y granulometrías: A) 100% pasto grueso, B) 50% pasto grueso y 50% pasto fino y C) 50% pasto grueso y 50% bagazo fino. Estas proporciones podrían variarse a conveniencia de la investigación, pudiéndose cambiar los porcentajes o aumentar la cantidad de combinaciones con el fin de determinar con cuales de estas la colonización y la consistencia al tacto del material

resultante es más favorable. La cantidad de series de muestras dependerá de los tipos de pruebas físico-mecánicas a realizarse en el material, que debería ser al menos dos, una destinada a utilizarse en pruebas de densidad y flexión y otra destinada a utilizarse en pruebas de compresión, aunque este número de series de muestras podría aumentarse según se desee realizar más tipos de pruebas físico-mecánicas. En esta fase también se evalúa el recipiente donde se realiza la siembra

Fase III: Pruebas físico-mecánicas

Esta fase consiste en determinar los tipos de pruebas físico-mecánicas a realizarse, de acuerdo con los alcances de la investigación. Además de las pruebas de densidad, flexión y compresión, puede evaluarse el estudio del comportamiento térmico del material para su utilización como aislante térmico, u otras propiedades. Estas pruebas deben realizarse según las normas estandarizadas, que le dan validez científica al método utilizado, como por ejemplo la norma ASTM C203-05 es la utilizada para las pruebas de flexión del material y las pruebas de densidad se realizan de acuerdo a la norma ASTM C303-10.