

UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA TIERRA Y EL MAR
ESCUELA DE CIENCIAS AMBIENTALES

**Estudio del efecto de la temperatura en el crecimiento del hongo
Pleurotus ostreatus como insumo para una nueva tecnología de
biodegradación del rastrojo de piña**

Proyecto de Graduación para optar por el grado académico de Ingeniería en Gestión Ambiental

Presentado por la postulante

JEANINA RUBÍ MORERA

Agosto, 2020

ACTA DE APROBACIÓN

El Tribunal Examinador aprobó el trabajo titulado:

Estudio del efecto de la temperatura en el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus*, como insumo para una nueva tecnología de biodegradación del rastrojo de piña

Como requisito parcial para optar al grado de Ingeniería en Gestión Ambiental

Miembros del Tribunal

Representante del Decano Facultad de Tierra y Mar

Director Escuela Ciencias Ambientales

Tutor(a) Ligia Dina Solís Torres

Lectora Diana Espinoza Navarro Lectora Adriana Vega Botto

Estudiante Jeanina Rubí Morera

Fecha: _____

DEDICATORIA

Dedicado a Dios por ser ese motor fundamental de vida, que me ha impulsado y fortalecido para llegar hasta el final de esta etapa.

Dedicado a los miembros de mi núcleo familiar, quienes estuvieron a mi lado alentándome en cada una de las etapas de este proyecto.

Dedicado a la familia Morera Pacheco, en definitiva, sin su colaboración y apoyo incondicional este sueño no se hubiera cumplido. Una dedicación especial a mi abuelita Marta Pacheco Vásquez, uno de los pilares de la familia, que con su calidez y amor me inspiró siempre a ser mejor.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la oportunidad de concluir un grado académico más, vivir nuevas experiencias y permitirme cumplir este sueño.

A mi madre María Morera Pacheco y mi hermano Luis Humberto Rubí Morera por su comprensión, por la colaboración en los momentos que podían hacerlo, por su fe en mí, por alentarme con sus palabras cuando las cosas se ponían cuesta arriba.

A la Escuela de Ciencias Ambientales, a la Escuela de Biología y a la Escuela de Ciencias Agrarias por compartir su conocimiento y facilitarme el uso de equipos indispensables para el desarrollo de este proyecto.

A mi tutora Ligia Dina Solís Torres, por su apoyo incondicional, su paciencia, ánimo, sus valiosas colaboraciones y enseñanzas a lo largo de este tiempo.

A mis lectoras, Adriana Vega Botto y Diana Espinoza Navarro, por su compromiso, su motivación, su tiempo y sus sugerencias, que fueron un gran aporte para esta investigación.

A la señorita Fabiola Villalobos Quirós, por su acompañamiento, su apoyo, su tiempo y sus sugerencias, que sin duda alguna dieron un gran aporte para la realización de este proyecto.

Al caballero Ricardo Jiménez Sánchez, por su valioso acompañamiento, su apoyo incondicional, su tiempo y su motivación para concluir esta etapa.

A las señoritas Cindy Alfaro Arce y Yoselin Quesada Villalobos, por su apoyo, su impulso y su fe en mí para llegar a la meta.

Resumen

Se realizó un estudio cuyo propósito fue evaluar el efecto de la temperatura en el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus*, con el fin de ser utilizado en el desarrollo de una nueva tecnología para la biodegradación del rastrojo de piña que se pretende que sea aplicable en la zona de Pital de San Carlos, se realizó un experimento de laboratorio con ensayos que contenían suelo, rastrojo e inoculación de hongo *Pleurotus ostreatus* en varias combinaciones, para ver su patrón de crecimiento a temperaturas de 10°C, 25°C y 47°C, determinadas por el estudio de las temperaturas de la zona de Pital de San Carlos. Dichos ensayos fueron evaluados cualitativamente por observación y cuantitativamente mediante el análisis del contenido de carbono y nitrógeno. Los resultados evidenciaron que el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* fue mayor en los ensayos colocados a las temperaturas de 10°C y 25°C, obteniendo resultados eficientes en el proceso de degradación del rastrojo de piña, que fue demostrado por una liberación mayor de nitrógeno y de carbono mineralizado, no así en temperaturas altas (47°C) donde el crecimiento no fue adecuado y por ende tampoco la degradación de rastrojo de piña. Se concluye que el hongo *Pleurotus ostreatus* es eficaz degradando rastrojo de piña tal y como se demostró en los ensayos de laboratorio, por lo tanto, esta tecnología de biodegradación de rastrojo de piña, es posible llevarla a un estudio a mayor escala.

Contenido

Introducción.....	1
Antecedentes.....	1
Justificación.....	5
Objetivos.....	9
<i>Objetivo general</i>	9
<i>Objetivos específicos:</i>	9
Marco teórico.....	10
Marco metodológico.....	18
<i>Enfoque y lugar de la investigación</i>	18
<i>Alcance de la investigación</i>	19
<i>Fases de la investigación</i>	19
Fase 1: Recopilación de la información.....	19
Fase 2: Organización del experimento.....	20
Inoculación del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i>	20
Obtención del rastrojo y suelo para la investigación.....	21
Fase 3: Ejecución del experimento Montaje de ensayos.....	21
Evaluación cualitativa de los ensayos.....	22
Evaluación cuantitativa de los ensayos.....	22
Resultados y discusión.....	22
Fase 1. Recopilación de la información.....	22
Fase 2: Organización del experimento.....	26
Inoculación del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i>	29
Obtención del rastrojo y suelo para la investigación.....	30
Fase 3: Ejecución del experimento Montaje de ensayos.....	30
Conclusiones.....	41
Recomendaciones.....	41
Bibliografía.....	43
Anexos.....	50

Índice de tablas

Tabla 1. Detalles del montaje del ensayo 1.....	30
Tabla 2. Detalles del montaje del ensayo 2.....	31
Tabla 3. Detalles del montaje del ensayo 3.....	31
Tabla 4. Evaluación cualitativa del crecimiento del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> durante el proceso del ensayo de degradación.	32

Índice de figuras

Figura 1. Temperaturas máximas y mínimas de la estación meteorológica Santa Clara-ITCR para el año 2006.	23
Figura 2. Temperaturas máximas y mínimas de la estación meteorológica Santa Clara-ITCR para el año 2013.	24
Figura 3. Temperaturas máximas y mínimas de la estación meteorológica Santa Clara-ITCR para el año 2016.	25
Figura 4. Temperaturas máximas y mínimas de la estación meteorológica Santa Clara-ITCR, durante el periodo 2006-2016.	26
Figura 5. Variación de la temperatura en el equipo de refrigeración #1.....	27
Figura 6. Variación de la temperatura en el equipo de refrigeración #2.....	27
Figura 7. Variación de la temperatura en la estufa #1.....	28
Figura 8. Variación de la temperatura en la estufa #2.	28
Figura 9. Contaminación del cultivo del hongo, medio PDA.....	29
Figura 10. Hongo sembrado con éxito, sin contaminación.....	29
Figura 11. Semana dos, crecimiento medio del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> , ensayo 1E1.....	32
Figura 12. Semana dos, inicio del crecimiento del microorganismo <i>Trichoderma spp</i> , ensayo 1E1.	33
Figura 13. Semana tres, inicio del crecimiento de hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> , ensayo 3E1.	33
Figura 14. Semana seis, crecimiento nulo del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> en los ensayos 2E1 (temperatura a 47°C).	34
Figura 15. Semana siete, crecimiento alto del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> sin presencia del microorganismo <i>Trichoderma spp</i> . ensayo 3E1.....	35
Figura 16. Semana siete, crecimiento medio del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> y presencia del microorganismo <i>Trichoderma spp</i> . ensayo 1E1.....	35
Figura 17. Semana nueve crecimiento medio del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> , mayor invasión del microorganismo <i>Trichoderma spp.</i> , ensayo 1E1.....	36
Figura 18. Semana once crecimiento alto del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> , ensayo 3E1.....	36
Figura 19. Semana once crecimiento bajo del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> , alta presencia de <i>Trichoderma spp.</i> , ensayo 1E1.	36
Figura 20. Semana trece desarrollo del cuerpo fructífero del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> , ensayo 3E1. ...	37
Figura 21. Semana catorce, ensayos 3E1 cuerpos fructíferos del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> desarrollados.	37
Figura 22. Porcentaje de carbono mineralizado presente en las muestras durante el proceso de degradación del rastrojo de piña.	39
Figura 23. Porcentaje de nitrógeno presente en las muestras durante el proceso de degradación del rastrojo de piña.....	40

Introducción

Antecedentes

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, los principales productores de piña a nivel mundial son Tailandia, Filipinas, Brasil, China e India. Entre los países con mayores niveles de exportación de esta fruta fresca se encuentran Costa Rica, Filipinas y Francia. En América Latina el principal productor de piña es Costa Rica, generando un 29% del total mundial (Food and Agriculture Organization of the United Nation [FAO], 2012).

En nuestro país, el cultivo de piña abarca más de 60 000 hectáreas, extendiéndose por todo el país de forma acelerada, alcanzando un crecimiento de más de un 300% en los últimos nueve años (Rojas, 2009). La producción de piña se da en diferentes zonas, las principales son: la Zona Atlántica (11 188 ha), la región del Pacífico (8 659 ha) y la zona Norte; siendo este uno de los sitios con mayor actividad productora de exportación, con un total de 24.653 hectáreas de cultivo (Cámara Nacional de Productores y Exportadores de Piña [CANAPEP], 2016).

Tal y como lo menciona Rojas (2009), los impactos provocados por este monocultivo son muy diversos, entre ellos se encuentran:

- Modificación y contaminación de los ríos, tanto de aguas subterráneas como superficiales.
- Contaminación de las aguas de acueductos públicos con plaguicidas como el Bromacil y otros químicos.
- Producción de lixiviados compuestos por sustancias contaminantes (fumigaciones).
- Desaparición de bosques y por ende su biodiversidad.
- Erosión del suelo.
- Pérdida de propiedades de la tierra.
- Daños a la salud humana por fumigaciones.
- Mal manejo de los residuos producidos (rastreo).

- Propicia una serie de plagas que afectan a las personas y al ganado, como lo es la mosca de establo.

Posterior a la cosecha del cultivo de piña se produce gran cantidad de residuos, alrededor de 300 toneladas de rastrojo por hectárea, siendo este el que se origina en mayor cantidad y el que provoca impactos negativos más severos (Rojas, 2015).

El rastrojo de piña es un residuo de lenta degradación, debido a sus componentes, lo que propicia la proliferación de algunas plagas por lo que se aplican diversas técnicas para acelerar el proceso de descomposición.

A lo largo del tiempo se han puesto en práctica algunas técnicas con el fin de acelerar el proceso de degradación del rastrojo, entre las más comunes se encuentran la aplicación de grandes cantidades de herbicidas quemantes entre ellos el Paraquat sobre el material de desecho, dicho químico ejerce impactos ambientales, por ejemplo las fuentes hídricas son de las más contaminadas debido a la lixiviación de estos compuestos en el suelo, las aspersiones y la aplicación en zonas aledañas a pozos, lagunas y riachuelos. Dichos compuestos afectan ampliamente la calidad del agua, puesto que la mayoría no son biodegradables (Alza Camacho et al., 2016).

De igual forma la persistencia y acumulación del Paraquat en la matriz edáfica ejerce efectos negativos sobre los organismos no blanco, como los hongos y las bacterias, entre los que hay especies muy sensibles a cambios ambientales cuando los suelos son sometidos a estos manejos causando la muerte de estos y disminuyendo la microbiota edáfica haciendo que la descomposición de materia orgánica sea afectada y por ende disminuye la fertilidad del suelo (Chan et al., 2014).

A nivel del aire tiene importancia cuando se trata de aplicaciones por medios aéreos; la gran extensión que abarcan éstas y el pequeño tamaño de las partículas contribuyen a sus efectos, entre los que se cuenta el "arrastre" de partículas a las zonas vecinas, fuera del área de tratamiento. Este efecto tiene importancia si contamina zonas habitadas o con cultivos, y se hace muy evidente cuando se emplean herbicidas de contacto que llegan hasta cultivos que son muy sensibles a los mismos (Del Puerto et al., 2014).

En muchas ocasiones el Paraquat es utilizado en conjunto con insecticidas como el Clorpirifos en los casos en donde se detecta la presencia de larvas de mosca, estos compuestos contribuyen a la reducción de daños y pérdidas producidas por malezas, insectos y enfermedades infecciosas, redundando además en la calidad y durabilidad de los productos alimenticios. Sin embargo, provocan contaminación de los suelos y fuentes de agua, y podría decirse que uno de los principales problemas a los que se enfrenta la población mundial por la presencia de residuos de plaguicidas en los productos agrícolas de consumo humano (Bernítez et al, 2015).

En el ser humano la toxicidad de los organofosforados, que es la familia a la que pertenecen algunos insecticidas, es muy conocida en el ámbito médico, pues puede derivar en efectos muy importantes relacionados con la inhibición de las colinesterasas (enzimas) en el espacio sináptico neuronal, provocando múltiples alteraciones en todo el cuerpo, debido a que la acetilcolina es un compuesto que es primordial en varios procesos fisiológicos y por ende su efecto es a todo nivel. Se podría expresar en varias formas, lo primero es que estos compuestos pueden ser absorbidos por varias vías, entre ellas la oral, aérea y dérmica principalmente. Una vez que tenemos este compuesto en el cuerpo puede dar complicaciones tanto agudas como crónicas, dentro de las agudas se puede mencionar una activación aumentada de los efectos colinérgicos muscarínicos que pueden estar en un gran abanico de síntomas que se derivan de la actividad del sistema parasimpático, por ejemplo alteración de la consciencia, alteración cognitiva, miosis, aumento de secreciones en todo el cuerpo (salivación, lagrimeo, congestión pulmonar, diarrea), micción incontrolada, bradipnea y bradicardia sostenida que eventualmente puede llevar al paciente a parada cardíaca y muerte; en cuanto los efectos nicotínicos estos provocan fasciculaciones y debilidad muscular. Al

final obedece a un cuadro de intoxicación severa que puede llevar fácilmente al paciente a un estado grave de compromiso cardiovascular, alterar la perfusión y eventualmente conducir a la muerte de los pacientes. Dentro de la intoxicación crónica podemos citar que se ha visto relacionado con un proceso de acumulación, en especial dentro de los tejidos adiposos, que a largo plazo pueden aumentar el riesgo de infertilidad o inclusive esterilidad, trastornos a nivel del sistema inmunológico, teratogeneicidad en mujeres embarazadas con malformaciones severas de los fetos y también en formación de neoplasias en especial del estirpe gástrico y colónico, por lo cual lo hace un compuesto muy peligroso tanto en intoxicación aguda como en crónica (Jiménez, 2020).

Asimismo, además de las medidas para el manejo de estos residuos que se nombraron anteriormente, también existen otros tipos de prácticas efectuadas comúnmente como son la creación de grandes fosas que se utilizan para enterrar los desechos generados por las actividades agrícolas, procediendo, posteriormente, a la quema física de los residuos restantes, provocando una liberación de grandes cantidades de contaminantes como gases de efecto invernadero, contribuyendo al calentamiento global.

Unido a lo anterior y derivado del mal manejo del rastrojo de piña se produce una proliferación de la mosca *Stomoxys calcitrans* conocida popularmente como la mosca de establo, la cual es un vector mecánico que puede provocar enfermedades infectocontagiosas afectando varios órganos y sistemas, en especial el gastrointestinal, que al final puede provocar efectos importantes en la salud pública y al sector ganadero.

Como parte de una iniciativa de la Universidad Nacional se desarrolla un proyecto llamado “Biodegradación de residuos agroindustriales del cultivo de piña (*Ananas comusus*) utilizando un consorcio de hongos y bacterias”, en el cual se lleva a cabo una investigación que busca desarrollar una tecnología de biodegradación de este rastrojo por medio de la utilización de un consorcio de microorganismos compuestos por cepas del hongo *Pleurotus ostreatus*, las bacterias *Lactobacillus spp*, *Bacillus subtilis*, y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En la primera investigación se logra establecer el inóculo de microorganismos para la degradación del rastrojo, demostrando que el consorcio utilizado sí degrada el residuo

en estudio (Rojas, 2015). En la segunda investigación se concluye que el consorcio crece tanto en suelos estériles como no estériles, además el crecimiento óptimo se observa cuando se utiliza una proporción de 6 gramos de suelo, 3 gramos de rastrojo y 1 ml de microorganismos y una humedad de 75% (Fajardo et al., 2015).

Las investigaciones mencionadas anteriormente han arrojado resultados positivos; sin embargo, se hace necesario continuar con la investigación, con el fin de profundizar en el tema y lograr una adecuada degradación del rastrojo de piña. En esta tercera parte se estudia el comportamiento del hongo *Pleurotus ostreatus* a diversas temperaturas, simulando en el laboratorio las condiciones de una finca piñera, con el fin de monitorizar a detalle el crecimiento de los microorganismos en los diferentes ambientes controlados. Dicha finca piñera utilizada como referencia para el establecimiento de los rangos de temperatura se ubica en el distrito de Pital, perteneciente al cantón de San Carlos, Costa Rica. Además, se realizó el análisis in vitro debido al desconocimiento y falta de información acerca de la efectividad del hongo *Pleurotus ostreatus* para la degradación del rastrojo de piña a diferentes temperaturas, evitando de esta manera una mayor inversión al realizarlo a gran escala.

Justificación

El cultivo de piña, en nuestro país y en diversas regiones, ha estado presente desde hace aproximadamente más de cincuenta años; iniciando con una producción para consumo local y en un pequeño porcentaje para la industrialización de pulpas, mermeladas y enlatados. A partir de 1986 se inicia la exportación de este producto, pero no es hasta el año 2000 donde se observa un crecimiento exponencial en las exportaciones del mismo, incrementándose de esta manera la cantidad de productores y de hectáreas dedicadas al cultivo de esta fruta. En la actualidad el cultivo de este producto se da principalmente en tres regiones: la Región Pacífico con un 19%, la Región Atlántica con un 25% y la Zona Norte con un 56%, sumando un total de 45 500 ha (Servicio Fitosanitario del Estado [SFE], 2018). Como se menciona anteriormente, la Región Huetar Norte es la principal zona productora de este cultivo, con un aproximado de 600 productores, ubicados principalmente en las zonas de San Carlos, Los Chiles, Aguas Zarcas, Pital, Guatuso, Upala y Sarapiquí (Méndez, 2010).

En el año 2015 Costa Rica produjo el 53% de la piña consumida en América del Norte y el 44% de la piña consumida en la Unión Europea, generando en nuestro país cerca de 28 000 empleos directos relacionados al cultivo, empaquetado y exportación de este producto (Servicio Fitosanitario del Estado [SFE], 2018).

Según estudios realizados por empresas multinacionales nuestro país cuenta con las mejores condiciones ambientales para el cultivo de la piña. Las características climáticas del país permiten que el ciclo productivo se adelante nueve meses con respecto al resto de los países productores de esta fruta en el mundo. En Costa Rica se produce todo el año y los picos de producción pueden ser inducidos dependiendo del comportamiento del mercado, lo cual representa una ventaja competitiva (Ministerio de Agricultura y Ganadería [MAG], 2007).

Esta fruta es sembrada en monocultivos con alta incidencia de erosión, donde se aplican fertilizantes líquidos, herbicidas, insecticidas y nematocidas. Pese a los beneficios económicos que genera esta actividad en el país, la producción de piña conlleva una serie de impactos ambientales, tales como contaminación por agroquímicos, incidencia de erosión, producción de plagas, invasión de áreas de protección y tala de árboles, los cuales están presentes desde la preparación del terreno para la siembra hasta la cosecha del producto (Esquivel et al., 2014).

Según Rojas (2015) en Costa Rica se han tramitado gran cantidad de denuncias contra fincas piñeras por causa de invasión en áreas de protección, construcción de canales, tala de bosques y contaminación de mantos freáticos. El sector agropecuario costarricense ha efectuado múltiples acciones en procura de conciliar los temas de conservación y producción; sin embargo, no ha sido posible mitigar en su totalidad el impacto de los agroquímicos aplicados en los monocultivos dedicados a la exportación de piña (Bach, 2007).

Como se mencionó anteriormente la producción de piña genera impactos ambientales de gran magnitud que van desde la preparación del terreno, la recolección del fruto hasta la generación de residuos. Uno de los principales problemas en cuanto al manejo de los

residuos procedentes de esta actividad, y por lo tanto uno de los mayores obstáculos para dicha producción, es el rastrojo de piña; este es un medio adecuado para la deposición de huevos de la mosca *Stomoxys calcitrans*, la cual es causante de graves problemas en el ganado y en animales domésticos, generando impactos socioeconómicos significativos en el sector ganadero (SFE, 2018).

En la actualidad, los productores han implementado distintos métodos para el manejo de los residuos. El más convencional consiste en la aplicación de herbicidas quemantes como el paraquat e insecticidas como clorpirifos; sin embargo, esta técnica no resulta conveniente desde el punto de vista ambiental, debido a que la aplicación de herbicidas produce contaminación de suelos, ríos y el ambiente en general (Proyecto Reduciendo el Escurrimiento de Plaguicidas al Mar Caribe [REPCar], 2009), añadido a lo anterior las autoridades del Centro de Investigaciones en Contaminación Ambiental (CICA) y de la Vicerrectoría de Investigación de la UCR, divulgaron resultados que revelaron la presencia de plaguicidas en algunas fuentes de agua en los distritos de Pital, Aguas Zarcas, Venecia de San Carlos y el cantón de Río Cuarto, estas como consecuencia de la producción de piña (Picado, 2018). Posteriormente, en algunos casos, se realiza una quema física del material vegetativo restante, lo que provoca un impacto negativo en el suelo debido a la pérdida de materia orgánica y a los cambios en la población microbiana. Otra de las técnicas utilizadas para la eliminación del rastrojo es la elaboración de fosas de gran profundidad en donde se entierran dichos residuos, provocando un efecto negativo en la regeneración del suelo, así como el aumento de la erosión y la escorrentía (Esquivel et al., 2014).

Además de los impactos ambientales y económicos mencionados se produce un impacto social, al realizar las fumigaciones con plaguicidas se dispersa la pluma de contaminación por acción del viento afectando la salud de las poblaciones vecinas (Rojas, 2016).

Ante esta problemática se realizan esfuerzos para encontrar soluciones que contribuyan al manejo de este desecho; una ellas es la aceleración del proceso de descomposición del rastrojo mediante una técnica ambientalmente amigable y accesible para los productores. En esta línea se desarrolla el proyecto de investigación “Biodegradación de residuos

agroindustriales del cultivo de piña (*Ananas comusus*) utilizando un consorcio de hongos y bacterias”, llevado a cabo en la Universidad Nacional, el cual busca generar conocimiento aplicable para el desarrollo de una biotecnología agrícola, buscando una disminución en la cantidad de plaguicidas aplicados y un aprovechamiento de la biomasa generada por la descomposición de las plantas de piña (Esquivel et al., 2014).

Para la degradación del rastrojo de la piña se han realizado dos investigaciones. En la primera se buscó desarrollar una tecnología de biodegradación a partir del desecho agroindustrial del cultivo de piña utilizando un consorcio de microorganismos compuestos por cepas del hongo *Pleurotus ostreatus*, las bacterias *Lactobacillus* spp, *Bacillus subtilis*, y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Etapa que concluyó con éxito al demostrar que efectivamente podía producirse la degradación del rastrojo con la ayuda de estos microorganismos (Rojas, 2015). La segunda investigación consistió en la comprobación del crecimiento de dichos microorganismos en distintos tipos de suelos (suelo estéril y suelo sin esterilizar procedentes de la Universidad Nacional de Heredia y de la zona de Pital de San Carlos), en el que se demostró el crecimiento de este consorcio de hongos y bacterias en los suelos analizados, obteniendo el mayor rango de crecimiento en el suelo sin esterilizar (Fajardo et al., 2015).

Con este proyecto se pretende trascender los logros alcanzados anteriormente. Se analizó el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* y la degradación del rastrojo de piña, tomando en cuenta la variable de temperatura. Este experimento se realizó mediante la creación de microcosmos en donde se simularon las distintas temperaturas habituales en las áreas de producción de piña, tanto del día como de la noche; se utilizó suelo sin esterilizar proveniente de la zona de Pital de San Carlos, con el objetivo de simular las condiciones climáticas del área de cultivo, a través de equipos simuladores de temperatura (estufas y equipos de refrigeración).

Se trabajó con el hongo *Pleurotus ostreatus* en lugar del consorcio de microorganismos debido a que según Rodríguez (2018), profesional que realiza investigación con esta especie, el hongo *Pleurotus ostreatus* cuenta con las características necesarias para degradar el rastrojo de la piña y que las bacterias *Lactobacillus* spp y *Bacillus subtilis* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* no contribuyen significativamente a la degradación del rastrojo

de piña.

El estudio de la temperatura se convirtió en una variable determinante, si el hongo *Pleurotus ostreatus* no lograba sobrevivir y degradar el rastrojo a las temperaturas ambientales de la zona de Pital de San Carlos, se invalidarían las dos investigaciones anteriores.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto de la variable temperatura en el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* mediante ensayos de laboratorio como insumo para el desarrollo de una nueva tecnología de biodegradación del rastrojo de piña en la zona de Pital de San Carlos.

Objetivos específicos:

1. Identificar las condiciones ambientales del área de estudio, haciendo uso de datos históricos de las estaciones meteorológicas del Instituto Meteorológico Nacional, como referente en el establecimiento de los valores de temperatura extremos en el análisis del crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* con los que se trabajará en el laboratorio.
2. Establecer a nivel de laboratorio los mecanismos necesarios para el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* que serán utilizados en los ensayos a las distintas temperaturas establecidas.
3. Determinar el efecto de la variable temperatura en el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* mediante el análisis del contenido de carbono y nitrógeno a distintas temperaturas, como insumo para el desarrollo de la tecnología de biodegradación del rastrojo de piña.

Marco teórico

Dentro de las tareas desarrolladas por un Ingeniero en Gestión Ambiental se encuentra la investigación de alternativas innovadoras dirigidas a la solución de diversos problemas ambientales; situación que es planteada en el presente estudio por medio de la búsqueda, creación y desarrollo de una tecnología amigable con el entorno, que proporcione una solución al problema del manejo inadecuado del rastrojo de piña, actualmente se revisa en la literatura y no se logra encontrar información suficiente o completa sobre un adecuado manejo de estos residuos, en especial de nuevas tecnologías de biodegradación.

Arce (2014) hace mención de una técnica para el aprovechamiento de estos residuos, al plantear un sistema de biodigestión para una finca productora de piña donde en promedio se cosechan 3 hectáreas por semana, a una densidad de siembra de 67 000 plantas por hectárea se tendría en promedio 100 toneladas al día de sustrato, generando biogás con el que se podría alimentar un co-generador con una potencia de 200 kW durante 18 horas.

Como lo menciona Castillo (2015) la piña es una planta monocotiledónea, herbácea y perenne, que posee la facilidad de adaptarse a climas cálidos y suelos degradados; su nombre científico es *Ananas comosus* y pertenece a la familia Bromeliaceae.

Esta planta se caracteriza por sus raíces fibrosas, cortas, huecas y muy superficiales, este sistema radicular puede medir hasta 30 cm de largo y un ancho total de 6.5 cm; posee un tallo corto y robusto que crece longitudinalmente entre de los 12 y los 24 meses; la planta adulta alcanza una altura de 1 a 1.2 m con un diámetro de aproximadamente 1.3 a 1.5 m (Castillo, 2015).

Tal y como lo menciona Jiménez (2011) citado por Rojas (2015) el ciclo de producción de la piña posee una duración de aproximadamente veinticuatro meses. A los primeros catorce meses y medio, se obtienen los frutos de la primera cosecha y la segunda cosecha diez meses después. Es importante mencionar que el sistema de cultivo de la piña para grandes productores es permanente, por lo tanto, todos los días se siembra y todos los días se corta.

Según Berrocal et al. (1997) durante la producción del cultivo de piña se generan diversos problemas dentro de los que se destacan: la erosión, compactación, deterioro en la actividad microbiológica, la producción como monocultivo y aplicación de plaguicidas.

- a) La erosión es producida por varios factores: las prácticas de preparación de los terrenos para la siembra, fuertes precipitaciones en algunas zonas del país, al ser un cultivo con un sistema radicular muy superficial propicia el lavado del terreno con gran facilidad.
- b) La compactación está asociada al uso de maquinaria pesada en los procesos de siembra y cosecha del cultivo, esta maquinaria por su peso afecta severamente los macroporos, encargados de facilitar las interconexiones para un adecuado movimiento del agua infiltrada a través del suelo, intercambio gaseoso y de propiciar un espacio adecuado para el crecimiento de las raíces (Gómez et al., 2017)
- c) El deterioro en la actividad microbiológica de los suelos se da por la utilización de herbicidas y fungicidas usados para combatir las plagas en el cultivo, provocando a largo plazo pérdidas en la capacidad productiva del suelo, que afectan el cultivo de piña y cualquier otro cultivo.
- d) Al ser la piña un monocultivo aumenta la posibilidad de ataque de plagas a los cultivos produciendo grandes pérdidas, además los factores climatológicos intervienen en la producción, del cual el ser humano tiene muy poco o ningún control, por último, en los monocultivos se genera una ruptura en la dinámica de los ecosistemas, al alterar el hábitat de muchas especies vegetales y animales.
- e) En la producción de esta fruta se utilizan plaguicidas y fertilizantes, que son rociados con barras de pulverización o “spray boom”.

Según MINAET et al. (2009) posteriormente al período de cosecha y con el fin de comenzar un nuevo ciclo productivo es necesaria la eliminación de la biomasa presente en el terreno, la cual recibe el nombre de rastrojo, generando un impacto ecológico y ambiental severo.

Tal y como lo menciona Quesada (2003) el rastrojo está compuesto por el tallo y las hojas de la planta, estos materiales son extremadamente fibrosos, tenaces y abrasivos, debido a su alto contenido de silicio; además también están compuestos por cordones de fibras específicos lo que le proporciona gran resistencia a la torsión. La morfología de las hojas de esta fruta provoca que las plantas se sequen muy lentamente, por esta razón es necesario cortarlas, con el fin de acelerar su desecación y descomposición (Viquez, 2008).

Según Rojas (2016) el tiempo de degradación del rastrojo de la piña es de aproximadamente 90 días. En cada hectárea se siembran 70 000 plantas de piña, cada planta produce 6 kg de rastrojo, para un total de 300 ton de rastrojo por hectárea producidos en un ciclo. Es por esta razón que el manejo para la eliminación del rastrojo de la piña en muchas ocasiones se convierte en un gran problema, debido principalmente a su gran volumen y a la característica de lenta degradación antes mencionada.

Convencionalmente la eliminación del rastrojo de plantaciones de piña han sido tratados mediante la aplicación de una serie de técnicas: creación de fosas, quema con plaguicidas, quema física y pase consecutivo de rastras.

Según Rojas (2015) en algunas ocasiones los productores recurren a la elaboración de profundas fosas en las que se entierran los residuos de rastrojos acumulando todo el material sin ningún tipo de tratamiento y produciéndose un proceso de degradación natural. Este método interviene negativamente en la regeneración del suelo debido a que la ausencia de la biomasa permite que los rayos del sol caigan directamente sobre el suelo, los lixiviados generados pueden filtrarse y llegar a aguas subterráneas, aumento de la erosión, la escorrentía y la propagación de plagas.

Otra técnica utilizada por los productores para la eliminación de este residuo es desecar el rastrojo con la aplicación de herbicidas. Según Viquez (2008) uno de los principales herbicidas utilizados para la eliminación del rastrojo de piña es el Dicloruro de dimetil-4,4'-bipiridilo, conocido popularmente como Paraquat, utilizándose alrededor de doce litros por hectárea, con varias aplicaciones. La utilización de este herbicida provoca una

gran afectación al medio ambiente, además su toxicidad es acumulativa, contaminando enormemente los suelos y poniendo en riesgo su uso para el futuro (Quesada, 2003). Así mismo este producto es altamente soluble en agua, inmóvil, de persistencia extrema en el suelo, estable en agua con sedimento y no es volátil; también se caracteriza por una toxicidad de alta a mediana en peces, crustáceos, aves, insectos, extrema toxicidad en algas y plantas acuáticas (Rojas, 2015).

Añadido a lo anterior también se utilizan una serie de insecticidas para la eliminación de posibles plagas, uno de los más utilizados es el Clorpirifos, aplicándose ocho litros por hectárea con varias repeticiones, el cual posee una baja solubilidad en agua, es moderadamente persistente en el suelo y ligeramente volátil. Igualmente, presenta una toxicidad extrema en peces, crustáceos, anfibios, insectos, alta toxicidad en algas, lombriz de tierra y aves (Rojas, 2015).

Adicionado al uso excesivo de plaguicidas y como parte del tratamiento convencional de los residuos de rastrojo, posterior a la aplicación de los plaguicidas se realiza la quema física o con fuego de los residuos que por lo general se efectúa treinta días después de la aplicación de plaguicidas cuando las plantas estén deshidratadas (García y Rodríguez, s.f.). Según Rodríguez (2012) citado por Rojas (2015) este procedimiento elimina microorganismos responsables de los procesos de regeneración del suelo. Igualmente, el suelo desnudo queda expuesto a la radiación solar directa y a procesos erosivos que facilitan la remoción de nutrientes y provocan que los sedimentos contaminen fuentes de agua. Además, tal y como lo menciona MINAET et al. (2009) esta práctica se realiza en sitios donde se desea hacer una rápida preparación del terreno entre diferentes ciclos.

Existen otras alternativas para el manejo de este residuo como por ejemplo el pase consecutivo de rastras con maquinaria sobre el terreno, esta técnica puede generar compactación en el suelo, por lo tanto, es necesario conocer las condiciones y características del suelo antes de utilizarla, además puede favorecer la proliferación de plagas (García y Rodríguez, s.f.).

Una de las principales problemáticas derivadas del mal manejo del rastrojo de piña es la proliferación de la mosca de los establos (*Stomoxys calcitrans*), este insecto requiere la descomposición de materia orgánica para completar su ciclo biológico, condiciones que son provistas por el rastrojo cuando se encuentra en estado de descomposición, esto sin mencionar lo lento que es dicho proceso de degradación MINAET et al. (2009). En Costa Rica se reporta el primer caso de ataque de mosca de establo en 1987 en Buenos Aires de Osa, detectándose altas poblaciones de este insecto (Porrás et al., 2006).

Esta mosca es la causante de graves problemas en las personas representando un serio riesgo sanitario al transmitir enfermedades importantes en especial intestinales u oculares (Quiceno et al., 2010). Por otra parte, en el ganado puede causar sensibilidad en las patas delanteras con formación de ampollas intradérmicas, las cuales llegan a formar heridas con sangre, además de provocar la pérdida de peso en los animales; es importante mencionar que *S. calcitrans* también es un vector mecánico de ciertas infecciones tales como anemia infecciosa equina, diarrea viral bovina, carbunco entre otras. Además, este insecto puede desplazarse hasta 20 kilómetros para alimentarse de la sangre de animales domésticos, especialmente ganado vacuno y equino, lo que acrecienta el problema (Rubí, 2016).

Según Alpízar (2007) los desechos derivados de la producción de piña son muy altos, lo que ha ocasionado denuncias que preocupan a las autoridades nacionales y a otros organismos.

Tal como se menciona en el artículo 50 de nuestra Constitución Política todo ciudadano tiene derecho a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, asimismo todo aquel que cause un daño al ambiente debe responder por éste. Además, el país cuenta con legislación encargada de regular la actividad agroindustrial y los residuos de esta, mediante la Ley de Protección Fitosanitaria y su Decreto N° 26921-MAG-Reglamento a la Ley de Protección Fitosanitaria, donde se menciona la obligación de las empresas agrícolas a controlar las plagas de importancia económica y manejar de manera adecuada

los rastrojos que se generan de las cosechas. Añadido a lo anterior el Servicio Fitosanitario del Estado (SFE) designa al Departamento de Vigilancia y Control de Plagas como responsable del plan preventivo y manejo de la plaga y proveerá de equipo, personal, recursos económicos y asistencia técnica (Porrás et al., 2006).

Debido a las regulaciones del MAG los productores de piña se ven en la obligación de buscar alternativas viables para el adecuado manejo de los residuos y así contribuir al control de las plagas, en este caso de la mosca de establo.

Debido al mal manejo del rastrojo de piña se hace necesario buscar soluciones dirigidas al aprovechamiento de esta biomasa desechada (Alpízar, 2007). La utilización de estos residuos sería una gran ventaja desde el punto de vista económico y ambiental, ya que representaría una fuente renovable de materiales, evitando su eliminación de manera inadecuada (Quesada, 2003), como por ejemplo en el uso de biomasa derivada del rastrojo de piña como materia prima para síntesis de aditivos para gasolina para mejorar su octanaje causando que la combustión de los hidrocarburos sea más rápida y completa, consumiendo menos energía y liberando menor cantidad de gases contaminantes (Irrás et al., 2013).

De esta forma se hace necesario el estudio de una técnica o estrategia que proporcione y asegure que el ciclo de producción, cosecha y tratamiento de residuos del producto en cuestión se torne más amigable con el ambiente, es decir una producción más limpia. El Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) define “Producción más Limpia” como “una estrategia integrada y continua de prevención, aplicada a los procesos, productos y servicios con el fin de lograr un uso más eficiente de los recursos naturales, y de ese modo aumentar la eficiencia ecológica, minimizar los desechos, reducir los riesgos a la salud y seguridad humana y al medio ambiente, generando soluciones en la fuente, más que al final de los procesos productivos” (Varela, 2009).

Como se ha mencionado anteriormente en este trabajo se usa de base dos investigaciones anteriores para el desarrollo de esta nueva tecnología, en la primera investigación se establece el inóculo de microorganismos apropiado para la degradación del rastrojo de piña y en la segunda investigación se demuestra que el consorcio de microorganismos crece tanto en suelos estériles como no estériles, siendo el crecimiento óptimo cuando se utiliza una proporción de 6 gramos de suelo, 3 gramos de rastrojo y 1 ml de microorganismos y una humedad de 75% (Fajardo et al., 2015).

Stainer et al. (1992) menciona que los microorganismos se definen como cualquier organismo de dimensiones microscópicas, estos se encuentran repartidos en una amplia variedad de grupos taxonómicos. En los últimos años se ha implementado el uso de microorganismos en la agricultura, por sus ventajas económicas, ecológicas y toxicológicas, aunque su desarrollo es muy limitado (Zeballos, 2006). Según Rojas (2015) los desechos considerados como agrícolas en su mayoría son residuos vegetales que están compuestos de celulosa, hemicelulosa y lignina. Muchos microorganismos producen enzimas hidrolíticas (celulasas, hemicelulasas, proteasas, lipasas, fosfatasas y arilsulfatasas) que pueden degradar los desechos vegetales e incorporar los nutrientes al ambiente.

Dentro de los microorganismos que degradan algunos residuos vegetales como el rastrojo de la piña se encuentran: el hongo *Pleurotus ostreatus*, las bacterias *Lactobacillus* spp y *Bacillus subtilis*, y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

El hongo *Pleurotus ostreatus* pertenece a la familia *Pleurotaceae*; este es un hongo degradador de materia orgánica que se alimenta principalmente de lignina y celulosa, estas son azúcares que se encuentran disponibles en la materia muerta, por ejemplo, la paja, rastrojo de maíz, caña trigo, cebada, entre otros. Además, este hongo requiere de un sustrato que posea celulosa para sobrevivir en el suelo, el cual no es su hábitat natural. Esta especie es considerada como agente primario de descomposición, ya que es capaz de utilizar los desechos de las plantas en su forma original sin que hayan pasado por proceso previo de degradación bioquímica o microbiológica (Carvajal, 2010).

Según la Universidad Autónoma de Madrid (2010) citado por Rojas (2015) en el campo de la biotecnología ambiental se ha desarrollado una gran variedad de herramientas tecnológicas que buscan emplear microorganismos para la comprensión y resolución de problemas ambientales tales como: biopesticidas, biorremediación de aguas, producción de biopolímeros, descontaminación de suelos, compostaje y la utilización de microorganismos para el tratamiento y reutilización de residuos agrícolas.

Tal y como lo menciona Fernández (1996) una tecnología biodegradable se basa en la degradación de los contaminantes orgánicos por la acción de los microorganismos. Existen varios factores que influyen en el proceso de degradación como por ejemplo: concentración de oxígeno, temperatura, pH y concentración de nutrientes. Para la biodegradación se utilizan bacterias del suelo o externas aportadas para biodegradar los compuestos orgánicos en el suelo.

Es de suma importancia conocer los factores que afectan el crecimiento y desarrollo de los microorganismos, así como los elementos que inciden en su destrucción o inactivación, estos son: temperatura, oxígeno, medio de cultivo, acidez, tiempo y actividad del agua (Barreiro y Sandoval, 2006).

Los microorganismos presentan una temperatura óptima para su crecimiento, asimismo presentan una temperatura máxima por arriba de la cual no crecen y una temperatura mínima por debajo de la cual tampoco se reproducen. Si la temperatura aumenta por encima de dicho máximo, la tasa decrece y el microorganismo queda inactivo por efecto del calor. En caso contrario, cuando la temperatura desciende, la tasa de crecimiento también disminuye hasta alcanzar la temperatura mínima de crecimiento; en este momento se puede generar un efecto letal muy lento de algunos organismos, quedando microorganismos viables en menor cantidad. Cabe mencionar que existen efectos subletales que dejan a los microorganismos lesionados, pero no muertos, pudiéndose recuperar al emplear medios y técnicas apropiadas (Barreiro y Sandoval, 2006). Es bajo esta premisa que la temperatura juega un papel trascendental y determinante para la

continuación del desarrollo de una nueva tecnología de biodegradación del rastrojo de piña.

La medición de la degradación de residuos orgánicos se realiza a través de la relación carbono/nitrógeno, la cual es un parámetro utilizado para determinar la degradación obtenida por la materia orgánica (Arias et al., 2005). El carbono es determinado por medio de una retrotitulación redox y el nitrógeno se determinará por el método oficial Kjendahl.

Durante la primera investigación se determinó la proporción apta para el experimento; esta proporción fue mejorada en la segunda investigación, la cual consiste en una proporción 2:1, misma que se utiliza en este proyecto.

Marco metodológico

Enfoque y lugar de la investigación

El estudio es de tipo experimental, simulando y controlando los parámetros de temperatura pertenecientes al área de siembra del monocultivo, con el fin de analizar el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* y la degradación del rastrojo efectuada por el microorganismo inoculado.

La elaboración del estudio presentó un enfoque mixto, debido a que en el desarrollo de la metodología se incluyen aspectos de carácter cualitativo y cuantitativo.

El enfoque cualitativo constituye la recolección de datos sin necesidad de recurrir a la medición numérica, sin conteo, por lo que se utiliza la descripción y la observación (Gómez, 2006). Este tipo de enfoque se ve reflejado por medio de la búsqueda de información en fuentes secundarias bibliográficas utilizadas como referencia para la determinación de los valores de temperatura a utilizar. La cualificación del proceso de crecimiento del hongo y degradación del rastrojo de piña se realizó de forma visual (observación).

De igual forma, el enfoque cuantitativo se concentra en la recolección y el análisis de datos, confía en la medición numérica, en el conteo y en el uso de la estadística, es decir

se caracteriza por realizar una medición de las variables en un determinado contexto (Gómez, 2006). En este estudio, el enfoque cuantitativo se determinó mediante diversas mediciones como el control de la temperatura, la determinación de carbono y la determinación de nitrógeno.

Alcance de la investigación

Se trabajó con el hongo *Pleurotus ostreatus*; con rastrojo de piña seco y molido de la zona de Pital de San Carlos y suelo del primer horizonte perteneciente al mismo lugar. El trabajo se realizó en Laboratorio de Docencia de la Escuela de Ciencias Ambientales.

Fases de la investigación

La investigación se realizó en tres fases, respondiendo a los objetivos específicos propuestos.

Fase 1: Recopilación de la información

En esta fase se recolectó la información necesaria para identificar los valores máximos y mínimos de temperatura, así como los valores típicos de la zona de estudio. Estos valores fueron recolectados de los últimos 10 años, como referente confiable del clima característico del sitio de estudio.

Para el establecimiento de los valores de temperatura con los que se trabajó, se tomó la información de fuentes secundarias, mediante la revisión de las estaciones meteorológicas facilitadas por el Instituto Meteorológico Nacional (IMN), específicamente de la estación meteorológica número 69579 Santa Clara-ITCR, punto de recolección de datos del IMN más cercano al área de estudio.

Una vez obtenidos los datos se elaboró un gráfico de cuadros y bigotes a modo de resumen, con las temperaturas máximas y mínimas de cada año del periodo seleccionado. Se

propone trabajar 5° más arriba del máximo y 5° más abajo del mínimo para tener un valor que represente una situación extrema sobre el microorganismo.

Fase 2: Organización del experimento

Verificación de los equipos de simulación de temperatura.

Para garantizar una estabilidad de la temperatura de trabajo se hizo una revisión del rango de incertidumbre de los equipos de control de la temperatura: de las estufas y de las refrigeradoras pertenecientes al Laboratorio de Docencia de la Escuela de Ciencias Ambientales, con el fin de asegurar que los rangos de temperatura elegidos no se vieran afectados por la incertidumbre de los equipos y de esta forma garantizar la veracidad de los datos que se obtuvieron. En estos equipos se colocaron los ensayos del experimento.

El análisis estadístico para el estudio de temperatura se realizó mediante gráficos para observar el comportamiento de la temperatura que se puede obtener para cada equipo.

Inoculación del hongo *Pleurotus ostreatus*.

Se trabajó con una muestra de material facilitada por el Proyecto “Biodegradación de desecho agroindustrial del cultivo de piña (*Ananas comosus*) utilizando un consorcio de hongos y bacterias”, código 0189-13, quien suministró el hongo necesario: *Pleurotus ostreatus*.

El procedimiento para realizar el cultivo microbiano está compuesto por los siguientes dos momentos:

- Se preparó el medio sólido para el hongo (Medio PDA), posteriormente se colocó el medio y el microorganismo en placas Petri esterilizadas. El hongo se colocó cada uno en una placa Petri; una vez colocado, se dejó crecer durante dos días.
- Se preparó el medio líquido para hongos (Medio PDA). El microorganismo se colocó en tubos falco y se dejó crecer por dos días.

Obtención del rastrojo y suelo para la investigación.

Estos materiales fueron adquiridos mediante una gira de campo a la finca productora el Pinar de INPROTSA en la zona de Pital de San Carlos. Al ser escala de laboratorio se trabajó con rastrojo triturado y molido. Se recolectó aproximadamente 3 kg de suelo y de rastrojo, que se transportó al Laboratorio de Docencia de la Escuela de Ciencias Ambientales.

Fase 3: Ejecución del experimento

Montaje de ensayos.

Durante esta etapa se desarrollaron ensayos a distintas temperaturas, temperatura máxima, media y mínima, utilizando las proporciones de suelo, rastrojo y microorganismos optimizadas por Fajardo et al. (2015), estas consistieron en una relación 2:1 suelo: rastrojo.

Se procedió a realizar la prueba de temperatura a través de un montaje de las réplicas, cada temperatura tuvo un total de 7 réplicas; el número de temperaturas máximas y mínimas con las que se trabajó respondió a los resultados de la fase 1, como mínimo se probaron tres distintas temperaturas.

Los ensayos fueron conformados de la siguiente manera:

- ❖ Ensayo 1: Suelo, rastrojo y el hongo *Pleurotus ostreatus*.
- ❖ Ensayo 2: Suelo y rastrojo.
- ❖ Ensayo 3: Suelo.

Los ensayos 2 y 3 se tomaron como controles del proceso. El ensayo 2 arrojó datos de la degradación del rastrojo por acción de la temperatura únicamente y el ensayo 3 fue el tratamiento cero completo de la investigación en el que se observó el comportamiento del suelo a las diferentes temperaturas expuestas.

Una vez elaborados todos los ensayos con sus respectivas réplicas se procedió a incorporar las mismas a la estufa y la refrigeradora, respectivamente, a las temperaturas determinadas.

Evaluación cualitativa de los ensayos.

Semanalmente se realizó una evaluación de cada una de las réplicas, a través de la observación, donde se valoró el crecimiento del hongo de forma comparativa, es decir comparando las muestras entre sí, utilizando indicadores como alto, medio y bajo.

Evaluación cuantitativa de los ensayos.

La degradación del rastrojo en los diferentes ensayos se llevó a cabo mediante el análisis del contenido de carbono y nitrógeno a distintas temperaturas. Dichas mediciones se efectuaron en un período de 100 días, realizándolas en tres momentos específicos: en el día 0, en el día 30 y por último en el día 100. El carbono se determinó mediante una retrotitulación redox con dicromato de potasio y sal de mohr, utilizando el método de Wlakey & Black; así mismo el nitrógeno se determinó por el método de Kjeldahl.

Resultados y discusión

Fase 1. Recopilación de la información

Las pruebas de laboratorio se iniciaron el año 2017, por lo que se tomaron en cuenta los datos de temperatura del año 2006 al año 2016 (ver anexo 1).

En la figura 1 se observa el comportamiento de la temperatura en la zona de estudio a lo largo del año 2006, donde la temperatura mínima registrada fue de 15,5°C en el mes de febrero y la máxima fue 33,3°C en el mes de mayo. En cuanto a la temperatura máxima en el año 2006 no se registró una variación significativa, en todos meses se mantuvo en un rango entre los 30-35 °C a diferencia de la temperatura mínima que entre los meses de junio y octubre aumentó más de 5°C respecto a los otros meses. Destaca que 15,5°C es el mínimo de temperatura registrado para los 10 años de análisis.

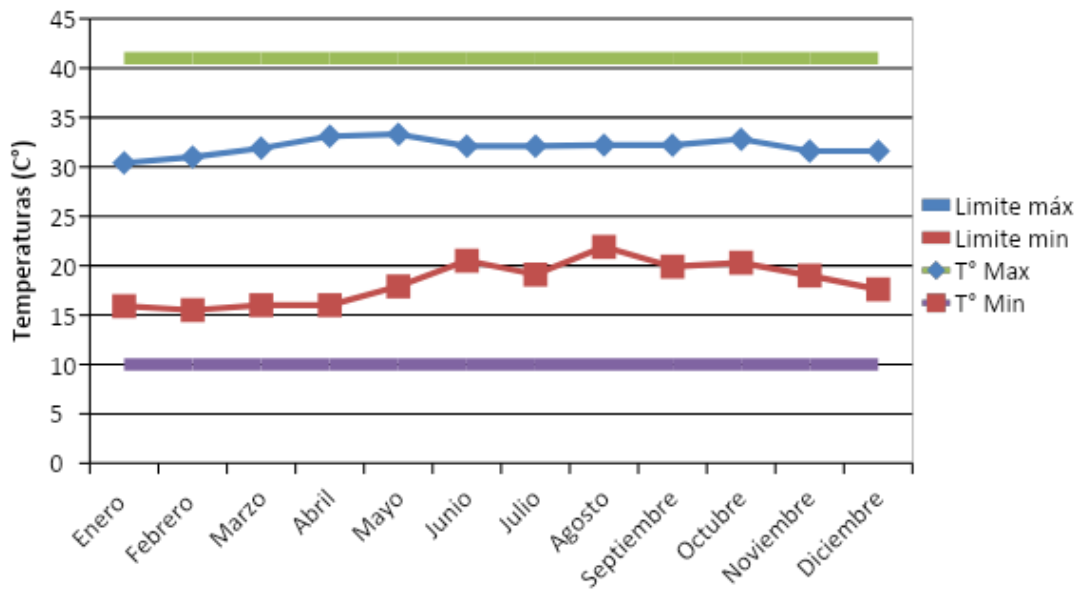


Figura 1. Temperaturas máximas y mínimas de la estación meteorológica Santa Clara-ITCR para el año 2006.

Fuente: Elaboración propia con base en IMN 2017.

La figura 2 muestra los mínimos y máximos de temperatura registrados durante el año 2013 en la zona de estudio, donde la temperatura mínima fue de 18,7°C registrada durante el mes de marzo y la máxima fue 39°C durante el mes de mayo.

A diferencia del año 2006 las temperaturas tanto máximas como mínimas variaron de forma significativa, más de 5°C, entre abril y julio, en los meses posteriores no se observa esta variación en las temperaturas.

Destaca que en este año se registró la temperatura más alta de los 10 años de estudio (39°), de acuerdo con la Organización Meteorológica Mundial citada por el diario Rojas (2013) el año 2013 fue uno de los años más calientes desde 1850.

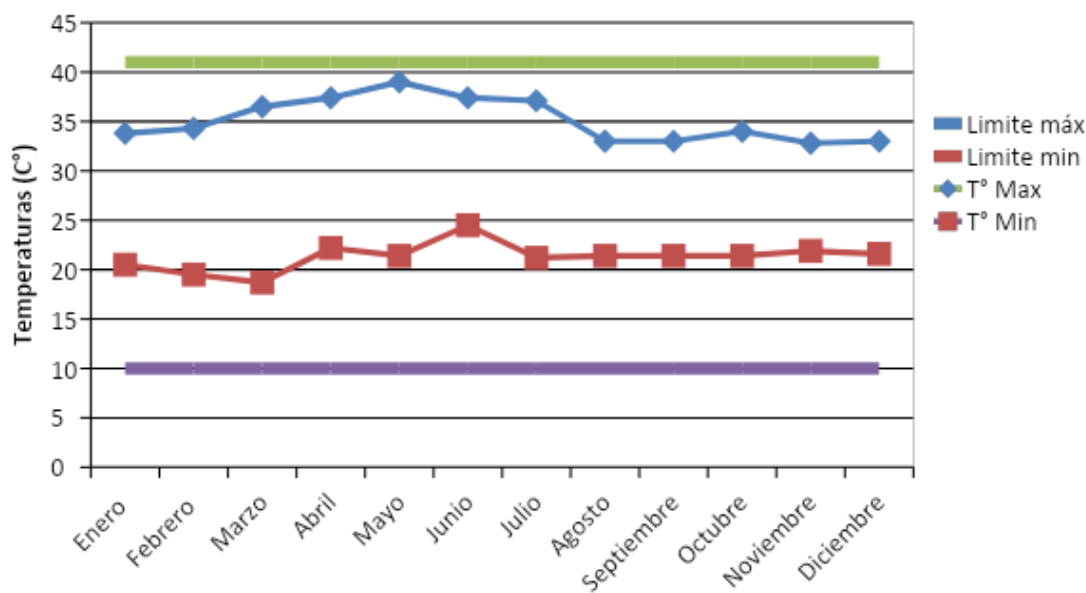


Figura 2. Temperaturas máximas y mínimas de la estación meteorológica Santa Clara-ITCR para el año 2013.

Fuente: Elaboración propia con base en IMN 2017.

La figura 3 muestra la variación entre las temperaturas máximas y mínimas en la zona de estudio durante el año 2016. La temperatura mínima fue de 18,6°C registrada durante el mes de enero y la máxima fue de 37,6°C registrada durante el mes de abril.

El histórico de temperaturas de la figura 1 a la 3 coincide con la literatura; INDER (2015) señala que la temperatura promedio anual en San Carlos es de 25°C. Lo que además coincide con las temperaturas idóneas para la siembra de piña, de acuerdo con Banacol (2010) el rango ideal para este cultivo es entre 20 y 30°C.

El rango de temperatura ideal para el cultivo de piña también es óptimo para permitir el desarrollo de adultos de mosca del establo (*Stomoxys calcitrans*), completar su ciclo de vida y seguir depositando huevos (Salem et al. citado por Gómez-Bonilla et al. 2018). Esto es relevante ya que, de acuerdo con Gómez-Bonilla *et al.* 2018 una de las principales problemáticas derivadas del mal manejo del rastrojo de piña es la proliferación de esta mosca, la cual es un parásito externo que afecta el ganado de carne y leche.

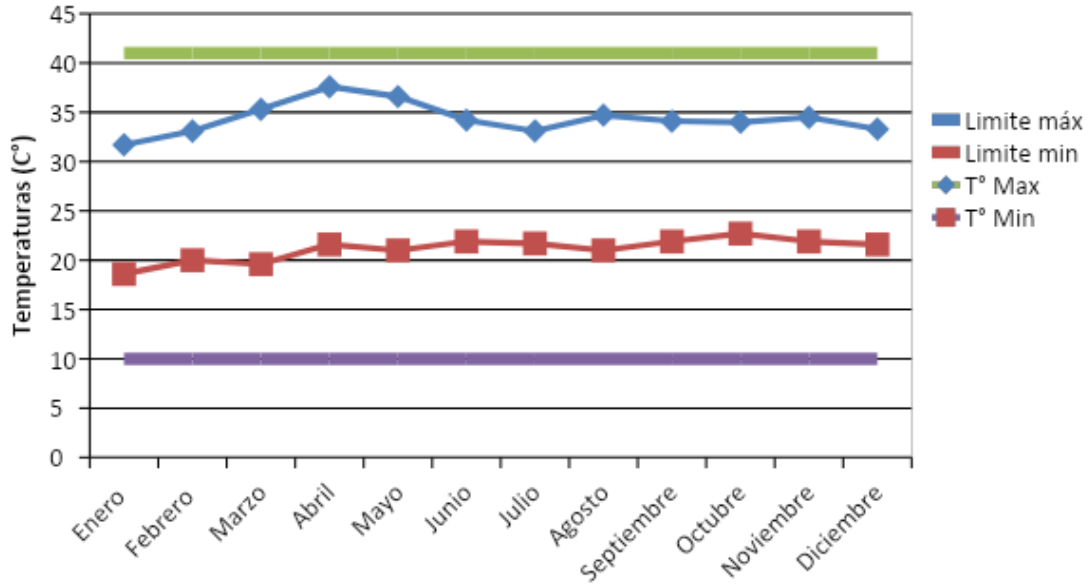


Figura 3. Temperaturas máximas y mínimas de la estación meteorológica Santa Clara-ITCR para el año 2016.

Fuente: Elaboración propia con base en IMN 2017.

La figura 4 muestra las temperaturas máximas y mínimas registradas en la zona de estudio durante el periodo entre los años 2006-2016. La temperatura mínima se registró en el año 2006 con una medición de 15,5°C y la máxima se registró en el año 2013 con una medición de 39°C.

En la figura 4 se observa una ligera tendencia al aumento de la temperatura tanto mínima como máxima. Esto se debe a la tendencia mundial al alza de las temperaturas por efecto del cambio climático, de acuerdo con Ochoa et al (2015), la temperatura mundial ha aumentado 0,4°C desde 1970 y se pronostica que esta tendencia continúe.

Debido al comportamiento en las temperaturas mencionando anteriormente se establece un límite máximo de temperatura en 47°C, procurando contemplar que la temperatura siga en aumento. El límite mínimo se establece en 10°C dejando un rango 4,5°C con el fin de considerar incluso las situaciones más extremas. Y la temperatura media se establece en 25°C.

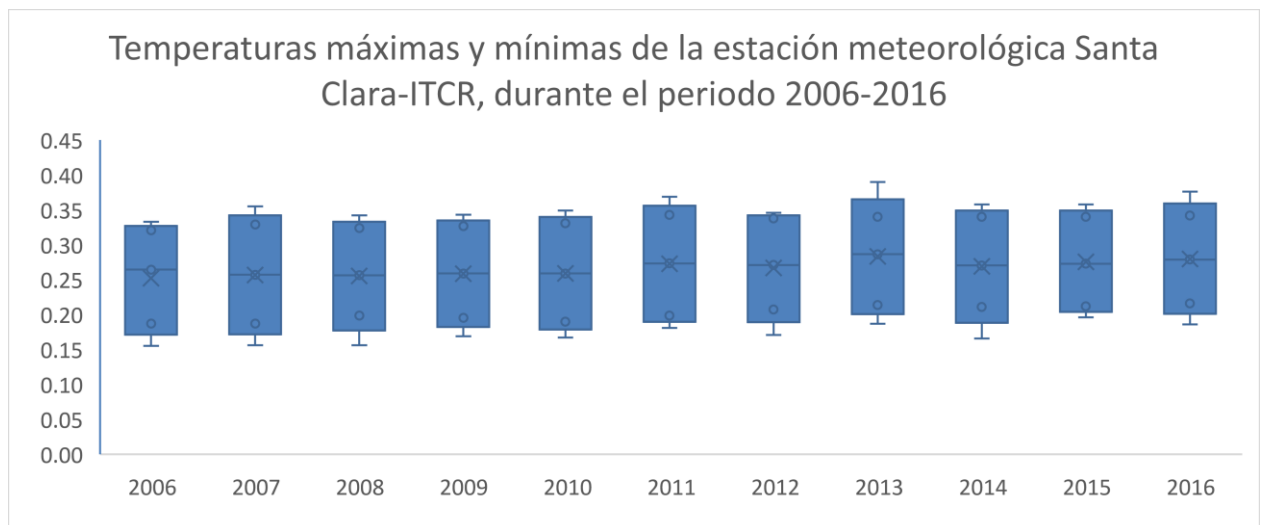


Figura 4. Temperaturas máximas y mínimas de la estación meteorológica Santa Clara-ITCR, durante el periodo 2006-2016.

Fuente: Elaboración propia con base en IMN 2017.

Fase 2: Organización del experimento

Verificación de los equipos de simulación de temperatura.

Equipo de refrigeración:

En la figura 5 se observan las temperaturas medidas en el equipo de refrigeración #1 durante tres días, en la figura 6 las temperaturas medidas en el equipo de refrigeración #2. Comparando ambas figuras se determina que el equipo de refrigeración #1 presenta menos variaciones en la temperatura que el equipo de refrigeración #2, por lo que se elige trabajar con el equipo de refrigeración #1 únicamente.

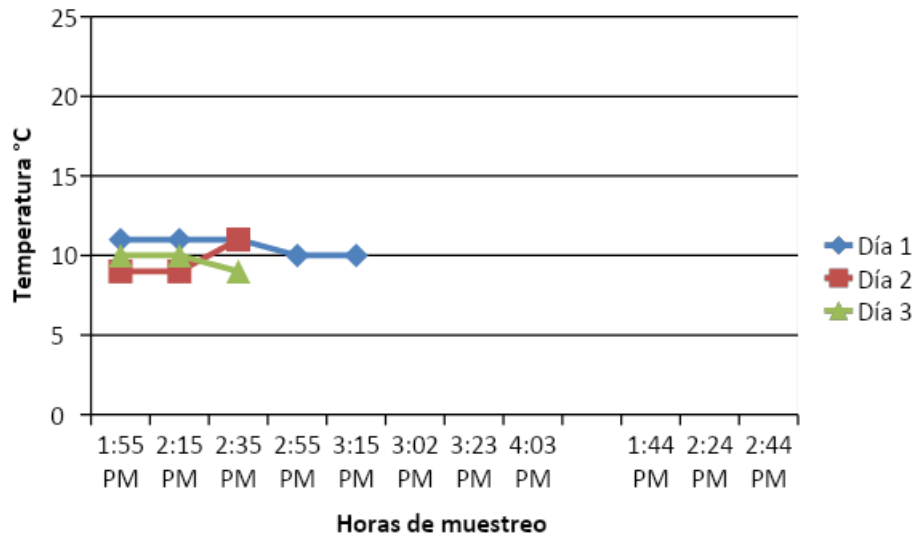


Figura 5. Variación de la temperatura en el equipo de refrigeración #1.

Fuente: Elaboración propia (2019).

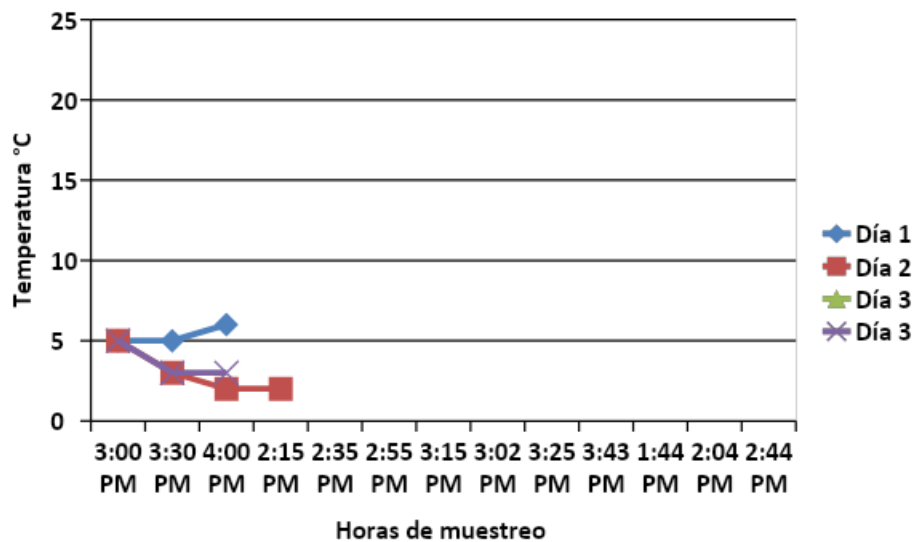


Figura 6. Variación de la temperatura en el equipo de refrigeración #2.

Fuente: Elaboración propia (2019).

Estufas:

En la figura 7 se observan los resultados de las mediciones de temperatura en la estufa #1 y en la figura 8 para la estufa #2. Ambas estufas presentan desviaciones propias de equipo que ha estado en uso por algunos años. Sin embargo, se determina que dichos equipos mantienen variaciones aceptables para el ensayo realizado.

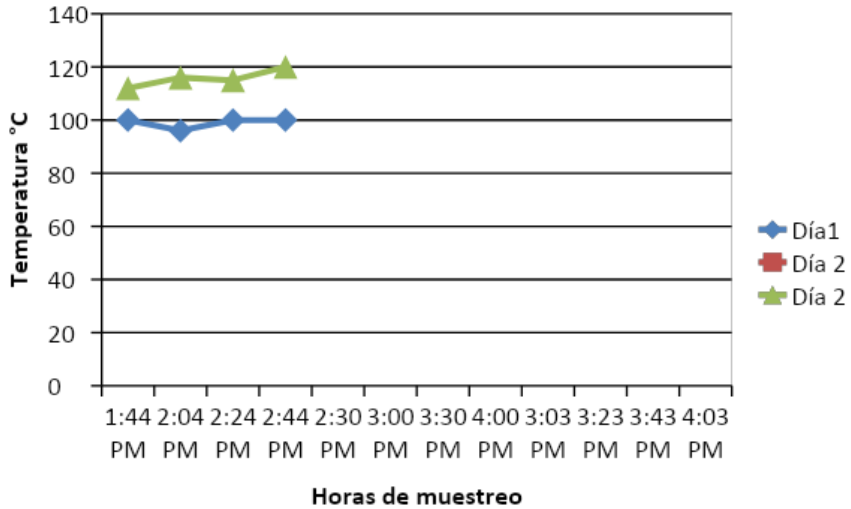


Figura 7. Variación de la temperatura en la estufa #1.

Fuente: Elaboración propia (2019).

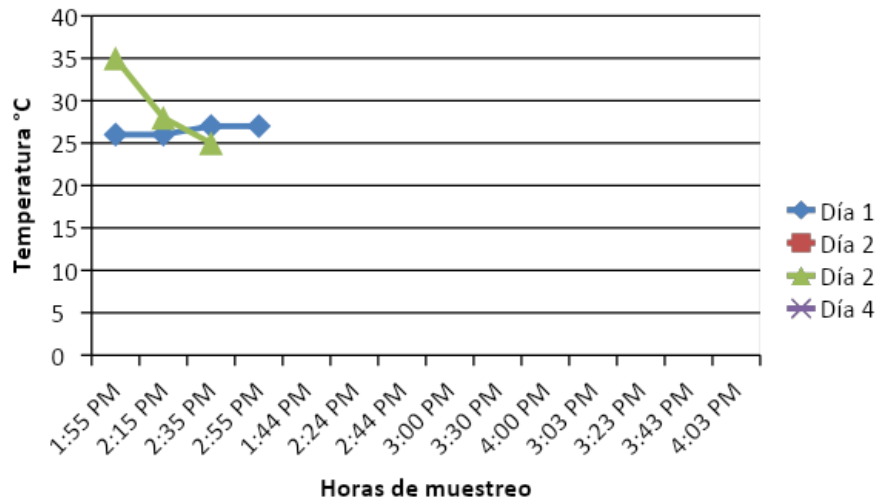


Figura 8. Variación de la temperatura en la estufa #2.

Fuente: Elaboración propia (2019).

Se realiza la verificación de los equipos de simulación de temperatura, con el objetivo de garantizar la estabilidad de la temperatura durante el tiempo de ejecución del experimento, asegurando que la misma no tenga variaciones significativas que pudiesen afectar de forma negativa los resultados obtenidos en los diferentes ensayos.

Inoculación del hongo *Pleurotus ostreatus*.

Al no contar con una cámara de flujo laminar se probaron sin éxito diversas técnicas para evitar la contaminación de los medios, por ejemplo, se utilizó una pecera para simular la función de la cámara; sin embargo, esta no soportó las temperaturas generadas por la lámpara de alcohol y las placas Petri se contaminaron como se muestra en figura 9.

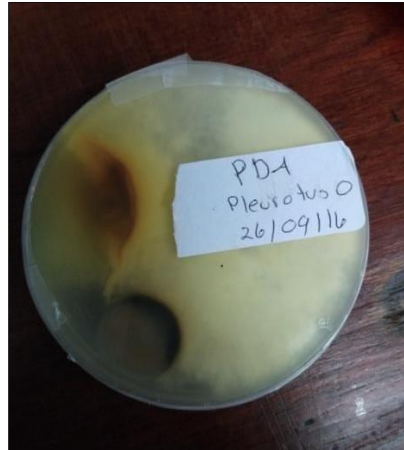


Figura 9. Contaminación del cultivo del hongo, medio PDA.

Se probó con la colocación de lámparas de alcohol en forma de luna al realizar el cultivo, pero esta técnica tampoco fue exitosa, el medio nuevamente se contaminó. Posteriormente utilizó una cámara de flujo laminar, en el primer cultivo también hubo contaminación al no dejar el medio solidificar dentro de la cámara; Rodríguez et al (2006) indica que, para el cultivo de hongos, los medios se deben servir en la cabina de flujo laminar y así garantizar la esterilidad de la preparación. Por último, se lavaron y esterilizaron los tubos falco con alcohol, se sirvió el medio de cultivo y se cultivaron los hongos dentro de la cámara de flujo laminar, con esta técnica se logró evitar la contaminación de la placa y el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* como se observa en la figura 10.

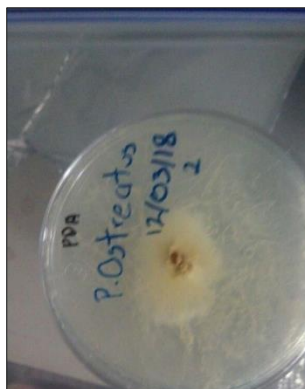


Figura 10. Hongo sembrado con éxito, sin contaminación.

Obtención del rastrojo y suelo para la investigación.

Se realizó una visita a la finca productora el Pinar de INPROTSA, donde se recolectó 3kg de rastrojo y de suelo. Posteriormente se trasladó al Laboratorio de Docencia de la Escuela de Ciencias Ambientales y se procedió a triturarlo y molerlo para poder utilizarlo a escalada de laboratorio.

Fase 3: Ejecución del experimento

Montaje de ensayos.

Con el hongo *Pleurotus ostreatus* en medio solido se procedió a replicarlo en otras placas Petri, utilizando un asa, se tomó parte del hongo y se colocó en medio líquido en varios Erlenmeyer. Posteriormente se agitó en la agitadora y se extrajeron alícuotas para colocarlas en nueve Erlenmeyer según el tipo de ensayo.

Ensayo 1

Tal y como se observa en la Tabla 1, el ensayo 1 se realizó a una temperatura media establecida de 25°C. Se colocaron tres réplicas del ensayo llamado 1E1 compuesto por suelo, rastrojo y hongo; tres réplicas del ensayo 1E2 en el que se colocó suelo y rastrojo y por último una réplica del ensayo 1E3 conformado únicamente por suelo. Todas las muestras mencionadas anteriormente se colocaron en la estufa #2.

Tabla 1. Detalles del montaje del ensayo 1.

Ensayo	Cantidad de réplicas	Temperatura	Equipo	Elementos
1E1	3	25°C	Estufa #2	Suelo, rastrojo y Hongo
1E2	3			Suelo y rastrojo
1E3	1			Suelo
Total	7			

Ensayo 2

En la Tabla 2 se observa que el ensayo 2 se colocó a una temperatura máxima establecida 47°C. Al igual que en el ensayo 1 se colocaron tres réplicas del ensayo llamado 2E1 compuesto por suelo, rastrojo y hongo; tres réplicas del ensayo 2E2 en el que se colocó suelo y rastrojo y una réplica del ensayo 2E3 conformado únicamente por suelo. Todas las muestras mencionadas anteriormente se colocaron en la estufa #1.

Tabla 2. Detalles del montaje del ensayo 2.

Ensayo	Cantidad de réplicas	Temperatura	Equipo	Elementos
2E1	3	47°C	Estufa #1	Suelo, rastrojo y Hongo
2E2	3			Suelo y rastrojo
2E3	1			Suelo
Total	7			

Ensayo 3

Como se observa en la Tabla 3 en el ensayo 3 se colocó a una temperatura mínima establecida 10°C. Colocando tres réplicas del ensayo llamado 3E1 compuesto por suelo, rastrojo y hongo; tres réplicas del ensayo 3E2 en el que se colocó suelo y rastrojo y una réplica del ensayo 3E3 conformado únicamente por suelo. Todas las muestras mencionadas anteriormente se colocaron en el equipo de refrigeración #1.

Tabla 3. Detalles del montaje del ensayo 3.

Ensayo	Cantidad de réplicas	Temperatura	Equipo	Elementos
3E1	3	10°C	Equipo de refrigeración #1	Suelo, rastrojo y Hongo
3E2	3			Suelo y rastrojo
3E3	1			Suelo
Total	7			

Evaluación cualitativa de los ensayos.

En la tabla 4, en el ensayo 3E1, colocado a una temperatura de 10°C, se observa un crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* negativo durante las semanas uno y dos, durante la semana tres a la cinco el crecimiento es bajo, en la semana seis el crecimiento fue medio y por último a partir de la semana siete y hasta el final del experimento el crecimiento fue alto.

En el ensayo 1E1 colocado a una temperatura de 25°C, se evidencia en la semana uno un crecimiento bajo del hongo *Pleurotus ostreatus*, luego desde la semana dos a la semana diez se observa un crecimiento medio y posteriormente este crecimiento decae y en la semana trece llega a ser negativo.

Por último, en el ensayo 2E1, colocado a una temperatura de 47°C, se observa un crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* negativo durante las semanas uno y dos, durante la semana tres a la cinco el crecimiento es bajo y por último a partir de la semana

seis y hasta el final del experimento el crecimiento fue negativo.

Es importante mencionar que en la tabla 4, no se ilustran los resultados obtenidos de los ensayos del tipo 1E2, 2E2, 3E2 y 1E3, 2E3, 3E3, debido a que, al ser controles del análisis, el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* fue negativo en todas sus réplicas.

Tabla 4. Evaluación cualitativa del crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* durante el proceso del ensayo de degradación.

Tipo de Ensayo		Semana													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1E1	Suelo, rastrojo y hongo	B	M	M	M	M	M	M	M	M	M	B	B	N	N
2E1	Suelo, rastrojo y hongo	N	N	B	B	B	N	N	N	N	N	N	N	N	N
3E1	Suelo, rastrojo y hongo	N	N	B	B	B	M	A	A	A	A	A	A	A	A
Nomenclatura: N: negativo, B: bajo, M: medio y A: alto															

Durante la semana dos del experimento, en los ensayos 3E1, colocados a 10°C no se observa crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* ni de microorganismo *Trichoderma spp.*. Continuando en la semana dos, en los ensayos 1E1 colocado a 25°C, se evidencia un crecimiento medio del hongo *Pleurotus ostreatus*, así mismo, se observa la presencia de un microorganismo, que según la identificación realizada por los expertos de la Escuela de Ciencias Agrarias corresponde a *Trichoderma spp.* (ver figura 11 y 12). En los ensayos 2E1, colocados a 47°C, en la semana dos, se observa un crecimiento negativo del hongo *Pleurotus ostreatus* y una baja presencia de microorganismo *Trichoderma spp.*



Figura 11. Semana dos, crecimiento medio del hongo *Pleurotus ostreatus*, ensayo 1E1.



Figura 12. Semana dos, inicio del crecimiento del microorganismo *Trichoderma* spp, ensayo 1E1.

De la semana tres a la cinco, en los ensayos 3E1, a una temperatura de 10°C, se observa un crecimiento bajo del hongo *Pleurotus ostreatus* (ver figura 13). En la semana tres, en los ensayos 1E1, a una temperatura de 25°C, se evidencia un crecimiento medio del hongo *Pleurotus ostreatus*, asimismo, es importante mencionar que a partir de la semana tres se observa un crecimiento alto del microorganismo *Trichoderma* spp.. Por último, de la semana tres a la cinco, en los ensayos 2E1, a una temperatura de 47°C, se observa un crecimiento bajo del hongo *Pleurotus ostreatus*.



Figura 13. Semana tres, inicio del crecimiento de hongo *Pleurotus ostreatus*, ensayo 3E1.

En la semana seis se observa, en los ensayos 3E1, a una temperatura de 10°C, se observa un crecimiento medio del hongo. Siguiendo en la semana seis, en los ensayos 2E1, a una temperatura de 47° C, que el hongo *Pleurotus ostreatus* no presenta crecimiento alguno, por el contrario, parece haber muerto (ver figura 14). En esta semana se observa que los ensayos están perdiendo humedad, debido a esto y de acuerdo con Rivera, et al (2013), la humedad del sustrato para el adecuado crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* debe ser alta, entre 80% y 85%. La humedad no se consideró originalmente en el experimento, con el fin de someter al hongo *Pleurotus ostreatus* a condiciones extremas y observar su comportamiento de crecimiento, dado que no se evidencia crecimiento significativo del hongo *Pleurotus ostreatus* hasta ese momento; por lo que se procedió a complementar el ensayo con la adición de agua, cabe resaltar que esta variable de la humedad se corrigió a tiempo para que no se viera afectado el resultado del crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* en el resto del experimento. Asimismo, es importante aclarar que los ensayos a todas las temperaturas tenían humedad al inicio, pero con el pasar de las semanas este fue disminuyendo, en especial el que estaba a una temperatura 47°C, condición que se corrige a tiempo realizando adición de agua.

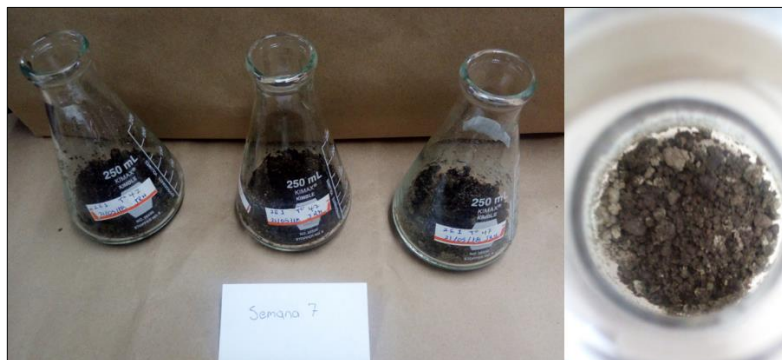


Figura 14. Semana seis, crecimiento nulo del hongo *Pleurotus ostreatus* en los ensayos 2E1 (temperatura a 47°C).

Durante la semana siete, en los ensayos 3E1, a una temperatura de 10°C, coincidiendo con la adición de agua, se observa que este procedimiento dio buenos resultados respecto al crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* siendo este alto, cabe resaltar que no hay presencia del microorganismo *Trichoderma spp.* (ver figura 15). Siguiendo en la semana siete, en los ensayos 1E1, a una temperatura de 25°C, se observa presencia del microorganismo *Trichoderma spp.*, manteniendo el comportamiento de las semanas anteriores y un crecimiento medio del hongo *Pleurotus ostreatus* (ver figura 16). En la semana siete, en los ensayos 2E1, a una temperatura de 47° C, no se observa el hongo *Pleurotus ostreatus* con vida.



Figura 15. Semana siete, crecimiento alto del hongo *Pleurotus ostreatus* sin presencia del microorganismo *Trichoderma spp.* ensayo 3E1.

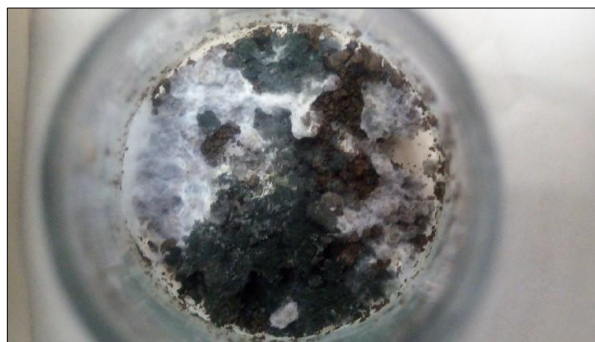


Figura 16. Semana siete, crecimiento medio del hongo *Pleurotus ostreatus* y presencia del microorganismo *Trichoderma spp.* ensayo 1E1.

En la semana nueve, en los ensayos 3E1, a una temperatura de 10°C, el hongo *Pleurotus ostreatus* continúa con un crecimiento alto. Siguiendo en la semana nueve, en los ensayos 1E1, a una temperatura de 25°C, el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* continúa siendo medio, sin embargo, se observa una mayor invasión del microorganismo *Trichoderma spp.* (ver figura 17).

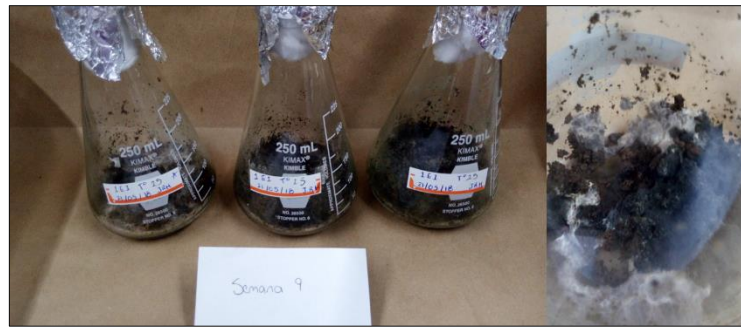


Figura 17. Semana nueve crecimiento medio del hongo *Pleurotus ostreatus*, mayor invasión del microorganismo *Trichoderma spp.*, ensayo 1E1.

Durante la semana once, en los ensayos 3E1, a una temperatura de 10° C, se continúa observando un crecimiento alto del hongo *Pleurotus ostreatus*, con presencia del mismo en las paredes y en el fondo del Erlenmeyer (ver figura 19). Continuando en la semana once, en los ensayos 1E1, a una temperatura de 25°C, observa un crecimiento bajo del hongo *Pleurotus ostreatus*, lo cual se presume que es debido a la competencia con el microorganismo *Trichoderma spp.* (ver figura 18).

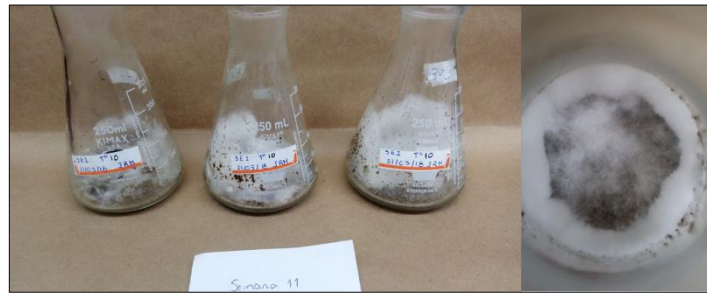


Figura 18. Semana once crecimiento alto del hongo *Pleurotus ostreatus*, ensayo 3E1.

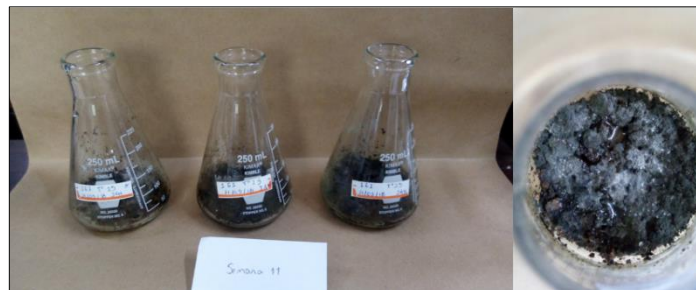


Figura 19. Semana once crecimiento bajo del hongo *Pleurotus ostreatus*, alta presencia de *Trichoderma spp.*, ensayo 1E1.

En la semana trece, en los ensayos 3E1, a una temperatura de 10°C, se observa el desarrollo del cuerpo fructífero del hongo *Pleurotus ostreatus* en todas sus replicas (ver figura 20), evidenciando que el hongo *Pleurotus ostreatus* crecio de una forma adecuada a bajas temperaturas. En la semana catorce en todas las réplicas de 3E1, a una temperatura de 10°C, se observa una alta presencia del cuerpo fructífero del hongo *Pleurotus ostreatus* (ver figura 21). Por último en la semana trece, en los ensayos 1E1, a una temperatura de 25°C, no se observa presencia del hongo *Pleurotus ostreatus*, sin embargo sí es posible observar existencia del microorganismo *Trichoderma spp.*.



Figura 20. Semana trece desarrollo del cuerpo fructífero del hongo *Pleurotus ostreatus*, ensayo 3E1.



Figura 21. Semana catorce, ensayos 3E1 cuerpos fructíferos del hongo *Pleurotus ostreatus* desarrollados.

El efecto de la temperatura en el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* se ha estudiado en investigaciones como la de Amílicar et al (2013) donde se encontró que el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* es mayor en el rango de temperatura entre los 10°C a los 25°C, y empieza a decrecer a una temperatura aproximada de 30°C. Dichos resultados son similares a los obtenidos en la presente investigación, donde el mayor crecimiento se observó en los ensayos colocados a una temperatura entre los 10°C y 25°C.

A pesar de estar dentro del rango de temperatura idónea para su crecimiento, en los ensayos a 25°C el hongo no sobrevivió y esto se debió a la invasión por parte de microorganismos del género *Trichoderma spp.* De acuerdo con Romero, et al (2009) *Trichoderma spp.*, presenta gran agresividad contra diversos hongos cultivados como el *Pleurotus ostreatus*. *Trichoderma spp.*, actúa según la especie como patógena o como competidora del cultivo de hongos.

Romero, et al (2009) también menciona que algunas especies de *Trichoderma spp.*, invaden rápidamente el sustrato, obstaculizando el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* mediante la producción de toxinas y antibióticos, al mismo tiempo que baja el pH hasta 4-5 que es más favorable para su crecimiento. Los propágulos pueden ser esparcidos por corrientes de aire, aerosoles, insectos, ácaros, herramientas y ropa, por lo que su control no es sencillo y su crecimiento óptimo se da entre los 20 y 28°C, esto se puede confirmar en los ensayos 3E1, donde la temperatura a la que estaban expuestos era de 10°C, causando un crecimiento nulo del microorganismo *Trichoderma spp.* y favoreciendo el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus*. Lo anterior es consistente con los resultados obtenidos en la presente investigación ya que los ensayos a 25°C presentaron altos crecimientos del género *Trichoderma spp.* y el hongo *Pleurotus ostreatus* no logró sobrevivir a dichas temperaturas.

Evaluación cuantitativa de los ensayos.

Como se muestra en la figura 22, en la línea 3E1, en los resultados obtenidos a una temperatura de 10°C se observó del día cero al día cien, un crecimiento exponencial en el porcentaje de carbono mineralizado, lo que indica una importante degradación por parte del hongo *Pleurotus ostreatus* sobre el rastrojo de piña. Este aumento fue mayor durante los últimos sesenta días del ensayo, datos que coinciden con el análisis cualitativo donde se observó un crecimiento significativo del hongo *Pleurotus ostreatus*.

Con respecto a la línea 1E1, en los resultados obtenidos a los 25°C, se observa que del día cero al día treinta se produce un aumento exponencial en el porcentaje carbono mineralizado debido al crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus*, lo que quiere decir que se produjo una degradación importante del rastrojo de piña. Posterior al día 30 este porcentaje de carbono mineralizado empieza a decaer debido al ataque del microorganismo *Trichoderma spp.* al hongo *Pleurotus ostreatus*, lo que nos indica que la degradación del rastrojo de piña es menor que en los días anteriores.

Como se observa en línea 2E1, a una temperatura de a 47°C el porcentaje de carbono mineralizado, desde el día cero al día treinta es mínimo, sugiriendo que no hay degradación significativa por parte del hongo *Pleurotus ostreatus* sobre el rastrojo de piña, estos datos concuerdan con los obtenidos mediante la evaluación cualitativa mencionada anteriormente, en donde no se evidencia crecimiento significativo del hongo *Pleurotus ostreatus* demostrando una intolerancia del mismo a las altas temperaturas.

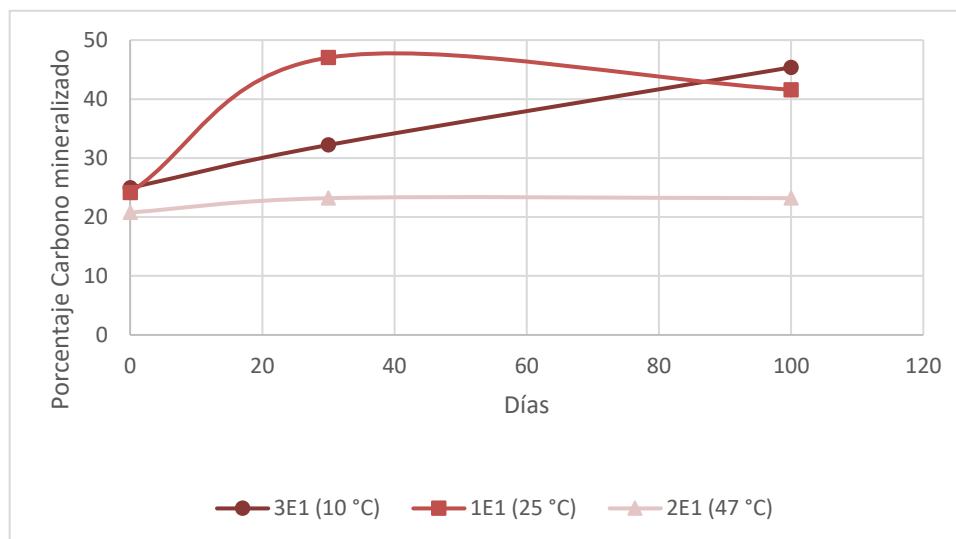


Figura 22. Porcentaje de carbono mineralizado presente en las muestras durante el proceso de degradación del rastrojo de piña.

Fuente: Elaboración propia (2019).

Como se muestra en la figura 23, en la línea 3E1 y 1E1, en los resultados obtenidos a una temperatura de 10°C y 25 °C se observó del día cero al día 30, un crecimiento exponencial en el porcentaje de nitrógeno mineralizado, lo que indica una importante degradación por parte del hongo *Pleurotus ostreatus* sobre el rastrojo de piña. Este aumento fue mayor durante este periodo del ensayo debido al inicio de la mineralización del nitrógeno, provocando una gran liberación de sales de nitrógeno o compuestos de carbono de pequeña masa molar que contienen nitrógeno que fueron medibles, siendo estas producidas por la descomposición de la materia orgánica, en este caso del rastrojo de piña. Para el día cien estos niveles se estabilizan debido a que obedece a la historia natural de una degradación de la materia orgánica, en donde existe una mineralización del nitrógeno muy alta para luego estabilizarse y convertirse en un compost maduro. Con respecto a la línea 2E1, en los resultados obtenidos a una temperatura de a 47°C el porcentaje de nitrógeno mineralizado, desde el día cero al día treinta es mínimo, sugiriendo que no hay degradación significativa por parte del hongo *Pleurotus ostreatus* sobre el rastrojo de piña.

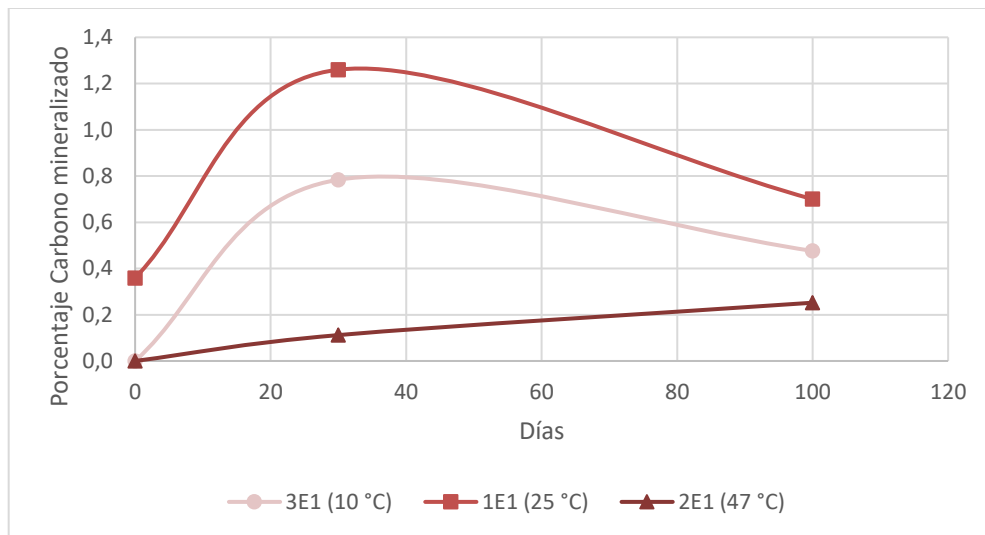


Figura 23. Porcentaje de nitrógeno presente en las muestras durante el proceso de degradación del rastrojo de piña.

Fuente: Elaboración propia (2019).

Conclusiones

- Se analizó el historial de las temperaturas mínimas y máximas registradas en la zona de estudio para el periodo 2006 – 2016 obteniendo como resultado una temperatura mínima de 15,5°C y una temperatura máxima fue de 39°C, con esto se establecen las temperaturas mínimas y máximas a las que se colocaron los ensayos de este experimento.
- Se estableció que el cultivo del hongo *Pleurotus ostreatus* por medio de técnicas alternativas (sin cámara de flujo laminar) utilizadas en este experimento no dieron resultados satisfactorios; fue hasta que se empleó la cámara de flujo laminar, que se logró el inocular el hongo *Pleurotus ostreatus* con éxito, por esta razón replicar estas condiciones en el campo resulta poco factible.
- Se observó durante el experimento que el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* fue mejor en los ensayos colocados a temperaturas que oscilaban entre los 10°C y los 25°C, evidenciado por una liberación mayor de carbono y nitrógeno mineralizado, lo cual se traduce en una mayor degradación del rastrojo de piña.
- Se concluyó que la nueva tecnología que se investigó en este estudio, no debe aplicarse en sitios de altas temperaturas, debido a que el hongo *Pleurotus ostreatus* entra en un estado de latencia en estas temperaturas y por ende degrada de forma menos eficiente el rastrojo de piña.

Recomendaciones

- Se recomienda para próximas investigaciones buscar una forma más sencilla de inocular el hongo, de forma que sea factible para su aplicación en el campo, por ejemplo, semillas.
- Se recomienda realizar un estudio del comportamiento del microorganismo *Trichoderma spp.* con el hongo *Pleurotus ostreatus*, en donde se evalúe la afectación a la eficiencia de degradación del hongo *Pleurotus ostreatus* con la presencia de este microorganismo.
- Por los hallazgos de este experimento, se recomienda investigar la aplicación del hongo *Pleurotus ostreatus* en otros residuos orgánicos que tengan una composición similar al rastrojo de piña y que además sean cultivados en zonas que posean temperaturas bajas, donde se demostró que el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* fue mayor.
- De acuerdo con los resultados obtenidos mediante este experimento, es posible analizar la aplicación del hongo *Pleurotus ostreatus* en una investigación a escala mayor.
- De acuerdo a los resultados obtenidos, en donde se observa que a temperaturas

más bajas el hongo *Pleurotus ostreatus* presenta un mayor crecimiento y por ende se obtienen mejores resultados en la degradación del rastrojo de piña, se recomienda hacer pequeñas fosas cubiertas con sombras naturales existentes, en donde se puedan enterrar los residuos de rastrojo de piña y el hongo *Pleurotus ostreatus* con el fin de alcanzar una disminución de la temperatura.

Bibliografía

Alpízar, J. (2007). Utilización de la biomasa residual del cultivo de piña (*Ananas comosus*) para la desproteínización enzimática de los desechos de la actividad camaronera (Tesis Lic9. Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

Alza, C. Et al. (2016). Determinación voltamétrica de paraquat y glifosato en aguas superficiales. Colombia. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/ccta/v17n3/v17n3a03.pdf>

Amílicar, J. Et al. (2013). Cinética del crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en la etapa de producción del cuerpo fructífero ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, vol. 47, núm. 3. La Habana, Cuba. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223129231008.pdf>

Arce, A. Et al. (2014). Determinación de la cantidad y composición de biogás a partir del rastrojo de piña (*Ananas comosus*) por medio de un sistema continuo de laboratorio. San José. Recuperado de <https://www.grupoice.com/wps/wcm/connect/bd310837-a437-491a-8b74-b98053902d2c/20150309EnsayorastrojodepinNa.pdf?MOD=AJPERES&CVID=10.sz0M>

Arias, G et al. (2005). Biotransformación de residuos lignocelulósicos con hongos *Pleurotus*. CENIC Ciencias Biológicas. Recuperado de <https://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/sites/default/files/articulos/CB-2005-4-CB-084.pdf>

Asamblea Legislativa de la República de Costa Rica. (1949). *Constitución Política de Costa Rica: artículo 50*. San José, CR.: Asamblea Legislativa de la República de Costa Rica.

Asamblea Legislativa de la República de Costa Rica. (1997). *Ley de Protección Fitosanitaria N°7664*. San José, CR.: Asamblea Legislativa de la República de Costa Rica.

Asamblea Legislativa de la República de Costa Rica. (1998). *Decreto N° 26921-MAG-Reglamento a la Ley de Protección Fitosanitaria*. San José, CR.: Asamblea Legislativa de la República de Costa Rica.

Bach, O. (2007). Agricultura e implicaciones ambientales con énfasis en algunas cuencas hidrográficas principales: Ponencia preparada para el Decimotercer Informe Estado de la Nación. Recuperado de http://estadonacion.or.cr/files/biblioteca_virtual/013/Agricultura-implicaciones-ambientales.pdf

Banacol. 2010. Manual de Buenas Prácticas Agrícolas para la producción de piña en Costa Rica. Proyecto “Colombia, Costa Rica, Nicaragua: Reduciendo el Escurrimiento de Plaguicidas al mar Caribe”. Recuperado de <http://cep.unep.org/repcar/proyectos-demostrativos/costa-rica-1/publicaciones-banacol/Manual%20BPA%20Banacol.pdf>

Barreiro, J y Sandoval, A. (2006). Operaciones de conservación de alimentos por bajas temperaturas. Editorial Equinoccio. Caracas, Venezuela.

Benítez, P. Et al. (2015). Residuos de plaguicidas en la cáscara e interior de la papa (*Solanum tuberosum* L.) proveniente de una región agrícola del estado Mérida. Venezuela. Bioagro. Recuperado de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612015000100004&lng=es&tlng=es

Berrocal, J et al. (1997). La Industria de la Piña en Costa Rica Análisis de Sostenibilidad. Costa Rica. Recuperado de <http://www.incae.edu/es/clacds/publicaciones/pdf/cen707.pdf>

Cámara Nacional de Productores y Exportadores de Piña. (2016). CANAPEP. San José, CR. Recuperado de <http://www.dinterweb.com/Canapep/historia/>

Carvajal, G. (2010). Evaluación de la producción de hongo *Pleurotus ostreatus* sobre cinco tipos de sustratos (Tamo de trigo, Tamo de cebada, Tamo de vicia, Tamo de avena y paja de paramo); enriquecidos con tusa molida, afrecho de cebada y carbonato de calcio. (Tesis Lic). Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Ecuador.

Castillo, J. (2015). Evaluación In Vitro del efecto antagónico de *Trichoderma spp.* sobre *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora nicotianae* obtenidos en plantaciones de piña (*Ananas comosus* (L) Merr.) (Tesis Lic). Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

Chan, W. Et al. (2014). Toxicidad in vitro de los herbicidas atrazina y paraquat sobre el crecimiento vegetativo y la esporulación de hongos saprobios del suelo. Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992014000400007&lng=es&tlng=e

Del Puerto. Et al. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-30032014000300010&lng=es&tlng=es

Esquivel, M et al. (2014). Biodegradación de desecho agroindustrial del cultivo de piña (*Ananas comosus*) utilizando un consorcio de hongos y bacterias (Formulación de proyecto). Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

Fajardo, A et al. (2015). Tecnología de biodegradación de rastrojo de piña: Resultados preliminares en suelos (Poster). Heredia, Costa Rica: Universidad Nacional-REDISA.

Fernández, R. (1996). Suelos contaminados. Instituto Tecnológico Geominero de España. Madrid, España.

Food and Agriculture Organization of the United Nation [FAO]. (2012). Agronoticias América Latina y El Caribe: la producción mundial de fruta tropical alcanzará 82 millones de toneladas

en 2014. Recuperado de [http://www.fao.org/agronoticias/agronoticias/detalle/es/?dyna_fef\[uid\]=159358](http://www.fao.org/agronoticias/agronoticias/detalle/es/?dyna_fef[uid]=159358)

García, A y Rodríguez, M. (s.f.). Proyecto “Colombia, Costa Rica, Nicaragua: Reduciendo el escurrimiento de plaguicidas al mar Caribe: Manual de Buenas Prácticas Agrícolas para la producción de piña en Costa Rica. Costa Rica. Recuperado de <http://cep.unep.org/repcar/proyectos-demostrativos/costa-rica-1/publicaciones-banacol/Manual%20BPA%20Banacol.pdf>

Gómez-Bonilla, Y., et al. 2018. Captura y recaptura de mosca del establo en ganado y rastros de piña. Recepción: 02-01-2017. Revista Alcances Tecnológicos. 12(1):37-47. Costa Rica
Gómez, M. (2006). Introducción a la metodología de la investigación científica. Córdoba, Argentina: Editorial brujas.

Gómez, N. Et al. (2017). La labranza mecanizada y su impacto en la conservación del suelo (revisión literaria). Recuperado de <https://www.scielo.sa.cr/pdf/tem/v31n1/0379-3982-tem-31-01-167.pdf>

Instituto de Desarrollo Rural de Costa Rica (INDER), 2015. Informe de caracterización básica Territorio San Carlos – Peñas Blancas – Río Cuarto. Oficina Subregional de San Carlos, Dirección Huetar Norte. Costa Rica Recuperado de <https://www.inder.go.cr/san-carlos-penas-blancas-rio-cuarto/Caracterizacion-San-Carlos-Penas-Blancas-Rio-Cuarto.pdf>

Irías, A. Et al. (2013) Pineapple-stover derived furan compounds as gasoline oxygenate additive. UNED Research Journal. Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/5156/515651977016.pdf>

Jiménez, R. (2020). Efectos de los organofosforados en el cuerpo humano [Entrevista]. Heredia, Costa Rica.

Méndez, G. (2010). Evaluación Preliminar de la Floración Natural del Cultivo de Piña (*Ananas*

Comosus) Híbrido Md-2, de Acuerdo a cuatro zonas altitudinales en la Región Huetar Norte de Costa Rica (Bachiller en Ingeniería en Agronomía). Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede Regional San Carlos.

Ministerio de agricultura y ganadería. (2007). Cadena agroalimentaria del cultivo de piña en distrito de Chires de Puriscal. San José, CR. Recuperado de <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/a00059.pdf>

Ministerio de Ambiente, Energía y Telecomunicaciones, Ministerio de Agricultura y Ganadería, PROAGROIN. (2009). Evaluación de impacto ambiental provocado por la eliminación de rastrojos de piña a través de su incorporación al suelo. Costa Rica. Recuperado de <http://cep.unep.org/repcar/proyectos-demostrativos/costa-rica-1/publicaciones-proagroin/pr-otocolo-rastrojo.pdf>

Ochoa, M. et al. (2015). Variabilidad y cambio climático: su repercusión en la salud. Facultad de Ciencia Médicas No. 2. Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1029-30192015000700008&script=sci_arttext&tlng=pt

Picado, H. (24 de julio de 2011). Contaminación de acueductos comunitarios en Pital y Río Cuarto causados por monocultivo de la piña. El País.cr. Recuperado de <https://www.elpais.cr/2018/07/24/contaminacion-de-acueductos-comunitarios-en-pital-y-rio-cuarto-causados-por-monocultivo-de-la-pina/>

Porras, S. et al. (2006). Plan de acción conjunto SFE/SENASA para el combate de la mosca del establo (*Stomoxys calcitrans*), Comisión Técnica Fitosanitaria / Dirección General SENASA. CRSFE- SENASA-PA-06-06. Costa Rica.

Proyecto Reduciendo el Escurrimiento de Plaguicidas al Mar Caribe. (2009). Evaluación del impacto ambiental generado por la eliminación del rastrojo de piña a través de su incorporación al suelo. Costa Rica. Recuperado de <http://cep.unep.org/repcar/proyectos-demostrativos/costa-rica-1/publicaciones-proagroin/pr-otocolo-rastrojo.pdf>

Quesada, K. (2003). Utilización del rastrojo de piña (*Ananas comosus*) como refuerzo de una resina poliéster comercial (Tesis Lic). Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

Quiceno, J. Et al. (2010). La Mosca Doméstica Como Portador De Patógenos Microbianos, En Cinco Cafeterías Del Norte De Bogotá. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v13n2/v13n2a04.pdf>

Rivera, O. Et al. 2013. Evaluación de residuos agrícolas como sustrato para la producción de *Pleurotus ostreatus*. Revista Luna Azul. Num 37. Manizales, Colombia. Consultado 2 oct 2019. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/3217/321729206008.pdf>

Rodríguez, A. (2018). Contribución del hongo *Pleurotus ostreatus* en consorcio de microorganismos [Entrevista]. Universidad Nacional, Costa Rica.

Rodríguez, N. et al. (2006). Producción de semilla comercial de hongos comestibles y medicinales. Cenicafé. Colombia. Recuperado de <http://biblioteca.cenicafe.org/bitstream/10778/854/1/Hongos%20comestibles%20medicinal%20Producci%C3%B3n%20semilla.pdf>

Rojas, D. (2015). Evaluación in vitro de la acción de un consorcio de hongos y bacterias en la degradación del rastrojo de piña (Tesis Lic). Universidad Nacional, Costa Rica.

Rojas, D. (2016). Rastrojo de piña, descripción de procesos [Entrevista]. Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

Rojas, I. (2009, 18 de julio). Los desastres de la piña en Costa Rica. Revista Biodiversidad. Recuperado de <https://www.grain.org/article/entries/1249-los-desastres-de-la-pina-en-costa-rica>

Rojas, P. (2013). El 2013 presenta registros históricos en altas temperaturas; Costa Rica y la región varían hasta 0,5 grados. San José, CR. Recuperado de <https://archivo.crhoy.com/el-2013-presenta-registros-historicos-en-altas-temperaturas-costa-rica-y-la-region-varian-hasta-05-grados/nacionales/>

Romero, O. Et al. 2009. Características de *Trichoderma harzianum* como agente limitando en el cultivo de hongos comestibles. Revista Colombiana de Biotecnología, Vol XI, No 2. Colombia

Rubí, L. (2016). Descripción básica de la mosca de los establos (*Stomoxys calcitrans*) [Entrevista]. Heredia, Costa Rica.

Servicio Fitosanitario del Estado. (2018). Piña costarricense podría llegar a Oceanía. San José, CR. Recuperado de <https://www.sfe.go.cr/Prensa2018/CP08%20Pi%C3%B1a%20costarricense%20podr%C3%ADa%20llegar%20a%20Ocean%C3%ADa.pdf>

Servicio Fitosanitario del Estado. (2018). Trituración de desechos orgánicos disminuye poblaciones de mosca del establo. Actualidad fitosanitaria, (32).

Stainer, R et al. (1992). Microbiología. Editorial Reverté, (2), p. 46.

Varela, I. (2009). Sistema nacional de incentivos a la producción más limpia en Costa Rica. Revista Tecnología En Marcha. Recuperado de https://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/116

Viquez, M. (2008). Obtención de madera plástica reforzada con rastrojo de piña (*Ananas comosus*) del desecho agroindustrial y poliolefinas postconsumo (Tesis Lic). Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica.

Zeballos, H. (2006). Agricultura y desarrollo sostenible. Plural editores. Bolivia, Ecuador.

Anexos

Anexo 1. Gráficos de temperaturas mínimas y máximas entre el año 2006 y 2016.

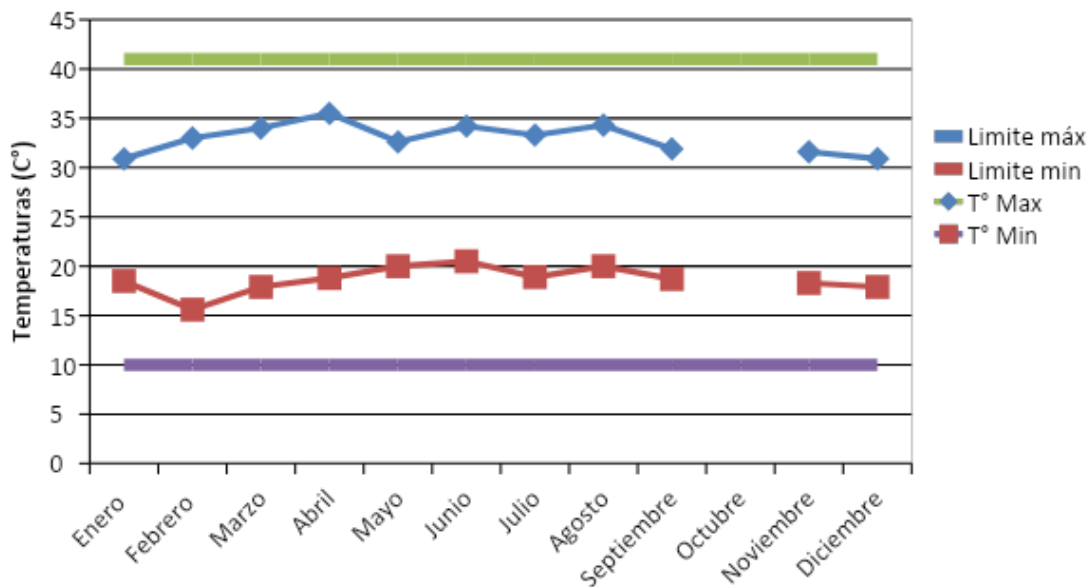


Figura1. Temperaturas máximas y mínimas de la zona en estudio para el año 2007

Fuente: Elaboración propia con base en IMN 2017

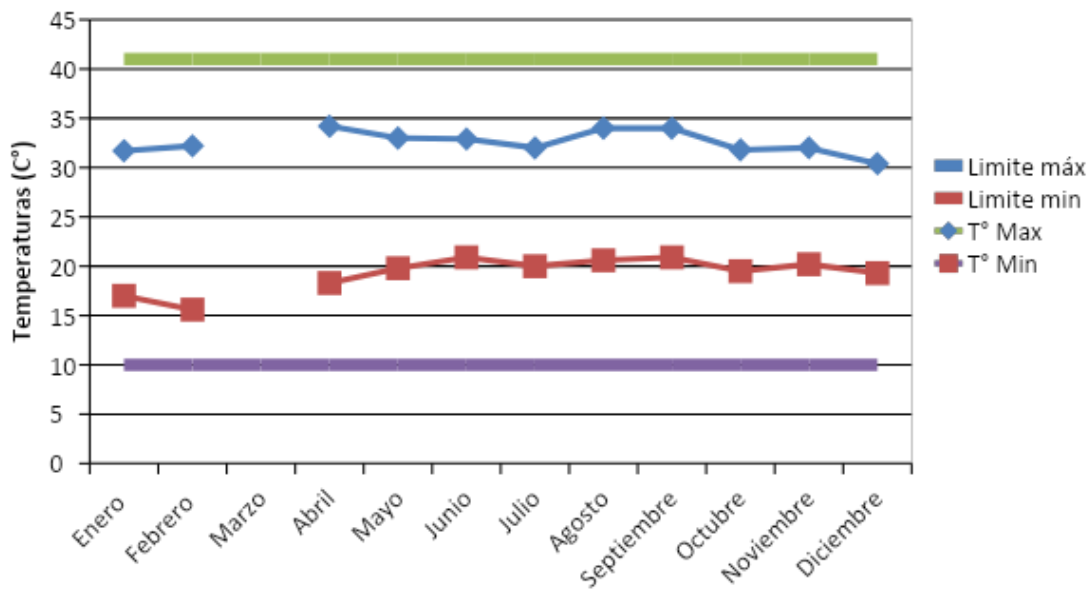


Figura 2. Temperaturas máximas y mínimas de la zona en estudio para el año 2008

Fuente: Elaboración propia con base en IMN 2017

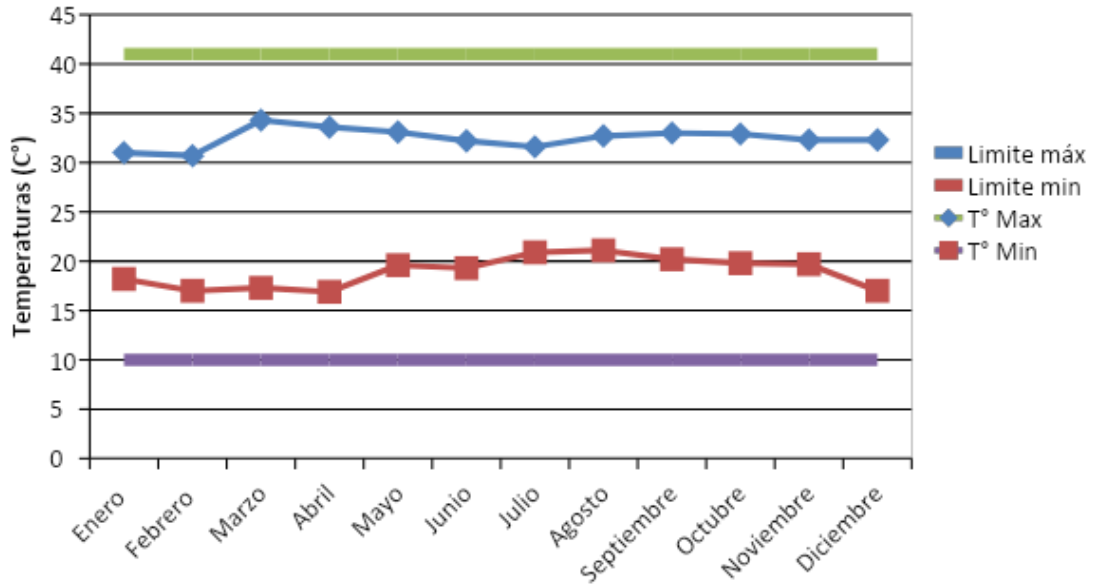


Figura 3. Temperaturas máximas y mínimas de la zona en estudio para el año 2009
Fuente: Elaboración propia con base en IMN 2017

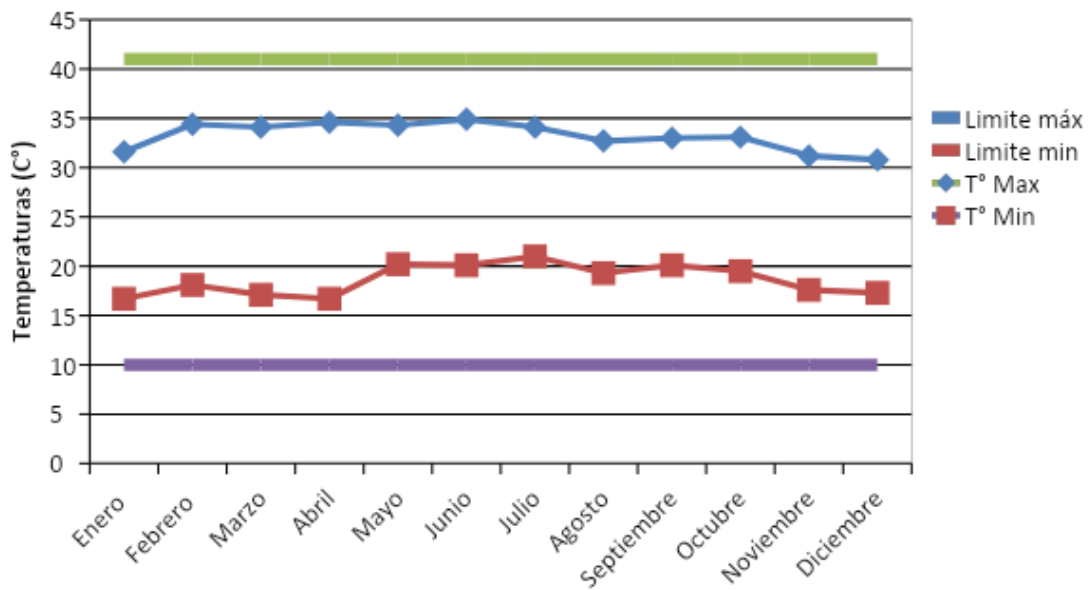


Figura 4. Temperaturas máximas y mínimas de la zona en estudio para el año 2010
Fuente: Elaboración propia con base en IMN 2017

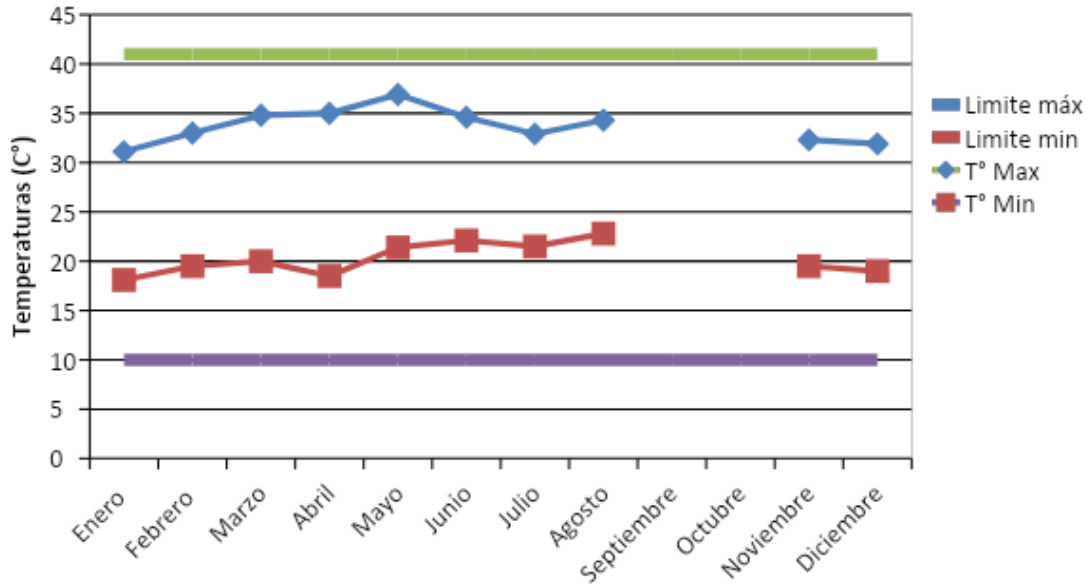


Figura 5. Temperaturas máximas y mínimas de la zona en estudio para el año 2011
 Fuente: Elaboración propia con base en IMN 2017

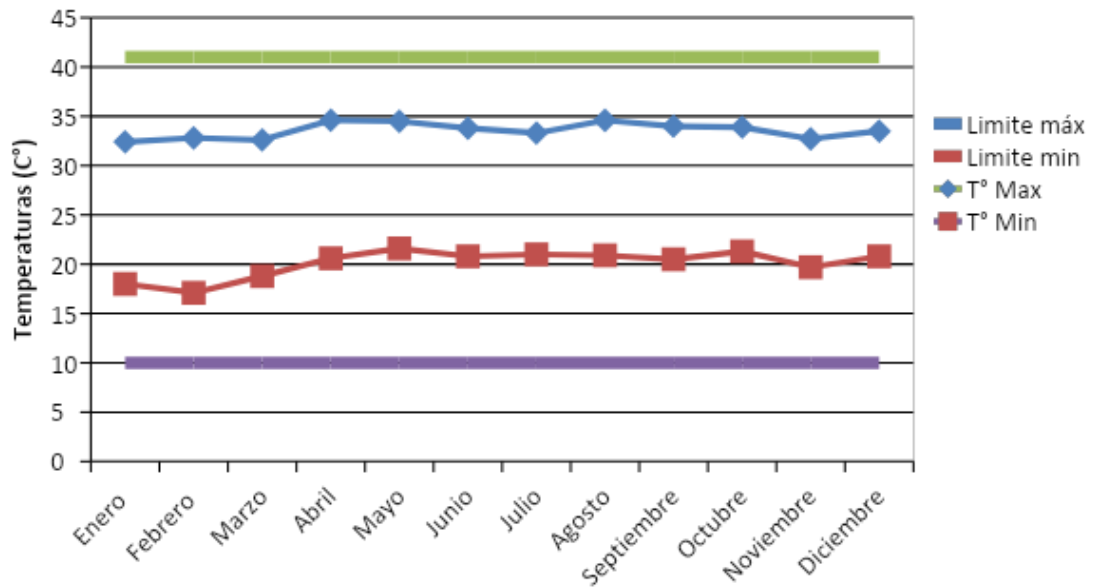


Figura 6. Temperaturas máximas y mínimas de la zona en estudio para el año 2012
 Fuente: Elaboración propia con base en IMN 2017

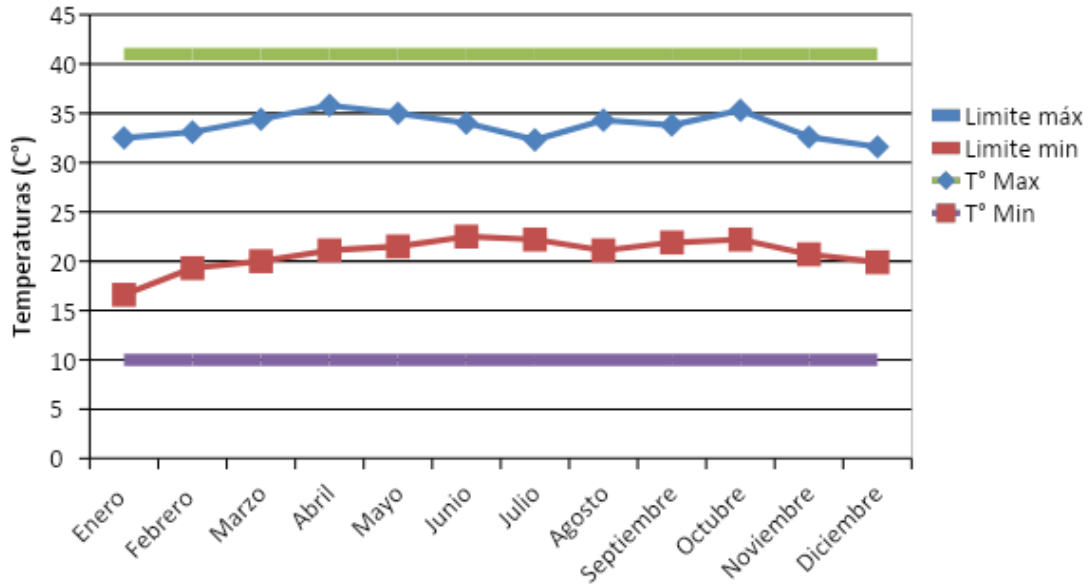


Figura 7. Temperaturas máximas y mínimas de la zona en estudio para el año 2014

Fuente: Elaboración propia con base en IMN 2017

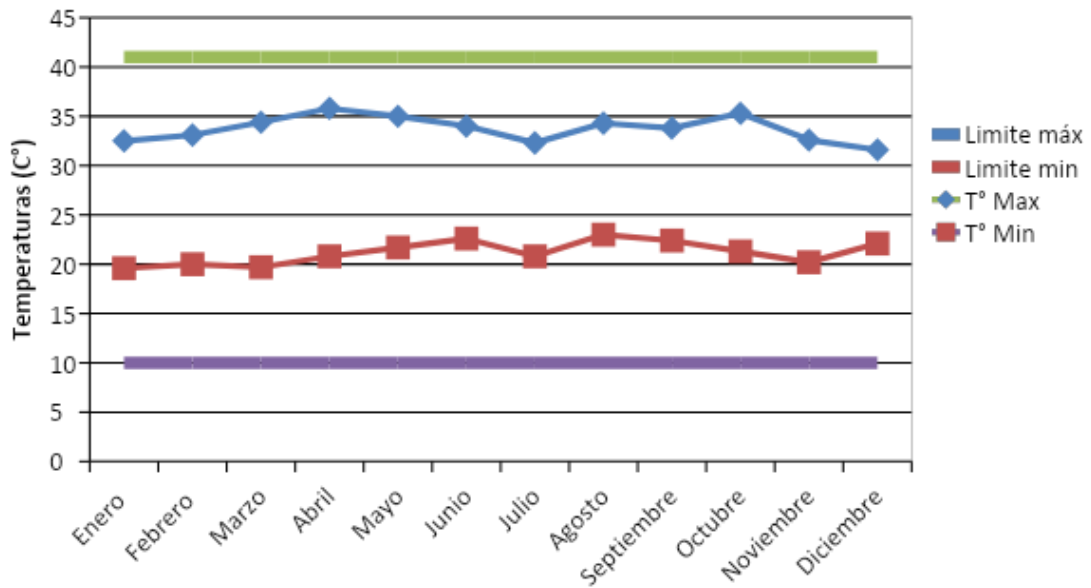


Figura 8. Temperaturas máximas y mínimas de la zona en estudio para el año 2015

Fuente: Elaboración propia con base en IMN 2017

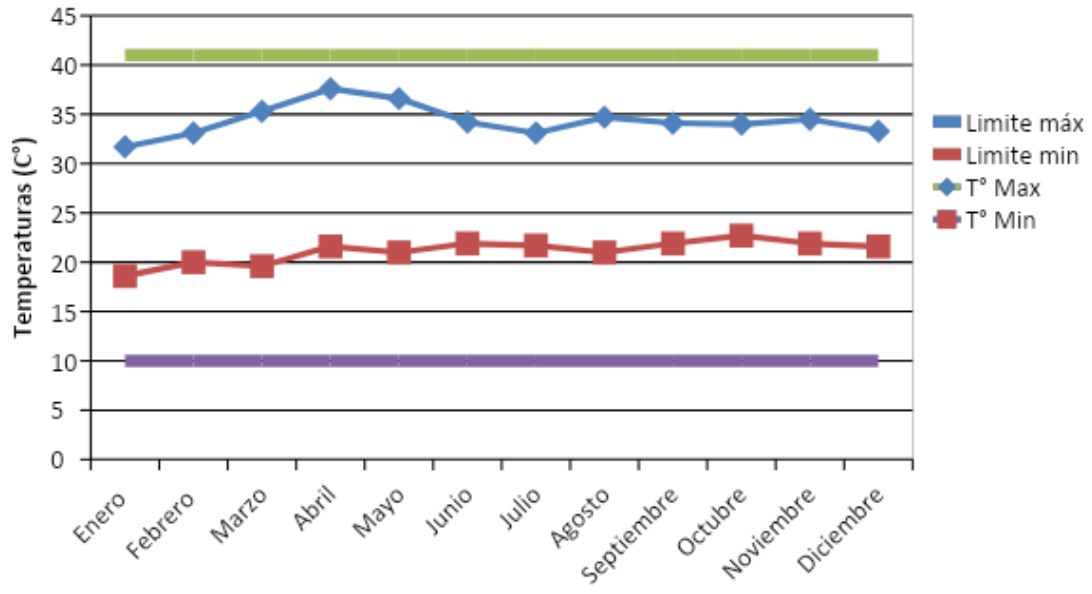


Figura 9. Temperaturas máximas y mínimas de la zona en estudio para el año 2016

Fuente: Elaboración propia con base en IMN 2017