

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COSTA RICA  
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA TIERRA Y EL MAR  
ESCUELA DE CIENCIAS AMBIENTALES  
LICENCIATURA EN GESTIÓN AMBIENTAL

EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE DEGRADACIÓN DE UN MICROORGANISMO  
SELECCIONADO EN RESIDUOS DEL PROCESAMIENTO Y EXTRACCIÓN DE ACEITE  
DE *ELAEIS GUINEENSIS* EN LA PLANTA INDUSTRIAL ACEITERA DE COTO 54.

Trabajo de graduación sometido a consideración del Tribunal Examinador de la  
Escuela de Ciencias Ambientales de la Universidad Nacional para optar al grado de  
Licenciatura en Ingeniería en Gestión Ambiental.

ESTUDIANTES:

MEYLIN BALLADARES CENTENO  
MARIEL ADRIANA FLORES QUIRÓS

Heredia, Costa Rica

Agosto, 2022

Trabajo de graduación aprobado por el Tribunal Examinador de la Escuela de Ciencias Ambientales de la Universidad Nacional de Costa Rica, para optar al grado de **Licenciatura en Ingeniería en Gestión Ambiental**.

MIEMBROS DEL TRIBUNAL EXAMINADOR

.....

Ph.D. Grace Wong Reyes

Decana de la Facultad de Ciencias de la Tierra y el Mar

.....

M.Sc. Stephanie Núñez Hidalgo  
Representante de EDECA

.....

M.Sc. Ligia Dina Solís Torres  
Tutora

.....

M.Sc. Marianelly Esquivel Alfaro  
Lectora

.....

M.Sc. Carmen Daly Duarte  
Lectora

.....

Bach. Meylin Balladares Centeno  
Postulante del trabajo

.....

Bach. Mariel Adriana Flores Quirós  
Postulante del trabajo

**Dedicatoria**

A nuestros padres, por forjarnos como personas con amor y respeto, por darnos los valores, alentarnos en cada etapa y por cada sacrificio realizado para incentivarnos a concluir con éxito nuestro proceso de educación.

A nuestras mascotas Luna y Tequila, por el amor incondicional y porque siempre estarán en nuestros corazones.

A nuestros hermanos, por todo el apoyo y colaboración en esta etapa.

## **Agradecimientos**

Primeramente, a Dios por guiarnos y permitirnos coincidir para realizar la investigación como un gran equipo logrando vivir toda la experiencia universitaria con éxito.

A nuestra tutora M.Sc. Ligia Dina Solís Torres, por ser una mentora, casi un ángel que con su luz propia nos guío y brindó todo su conocimiento y paciencia cada vez que nos surgían dudas y consultas. Infinitas gracias profe.

Al Laboratorio de Docencia y Extensión de la Escuela de Ciencias Ambientales, el Laboratorio de Hidrogeología y Manejo de Recursos Hídricos y al Laboratorio de Polímeros de la Universidad Nacional de Costa Rica por colaborarnos, brindarnos la infraestructura y materiales fundamentales para los análisis realizados.

A la empresa Palma Tica S.A y la Compañía Industrial Aceitera de Coto Cincuenta y Cuatro S.A., por abrirnos las puertas de la empresa para realizar la investigación en campo y compartirnos la información y recursos necesarios para realizarla.

Al Departamento de investigación (UIPT) y Laboratorio de Análisis de Suelos y Foliare de Compañía Palma Tica S.A, por toda su colaboración en el estudio y permitirnos realizar los análisis de campo.

Al Lic. Daniel Ramírez Guerrero, por toda la colaboración y logística para llevar a cabo el estudio en la empresa.

A nuestras lectoras M.Sc. Marianelly Esquivel Alfaro y M.Sc. Carmen Daly Duarte, por toda su colaboración y disposición para revisar y brindar aportes en la investigación.

A nuestra familia, por brindarnos su apoyo incondicional durante todo el proceso universitario.

A Luis, por ser un gran hermano, un gran ejemplo a seguir y brindarme todo su apoyo incondicional.

Una a la otra, por siempre creer, apoyarnos, ser luz en el camino y porque cada sacrificio valió la pena.

Y a cada persona que nos colaboró con información, que nos alentó a continuar, que nos aconsejó, que nos brindó su amistad y que formó parte indirecta del proyecto en su ejecución.

## Resumen

En la actualidad es necesario la búsqueda de alternativas que suplan las necesidades de la agroindustria, de manera que logren realizar las actividades económicas con regularidad sin sacrificar el ambiente para cumplirlo. Una de las industrias con mayor desarrollo a nivel nacional es la extracción y producción de aceite de palma africana la cual genera una gran cantidad de empleos en las zonas donde su cultivo se lleva a cabo, así mismo debido al proceso característico que se utiliza para obtener el aceite se generan grandes cantidades de residuos agroindustriales en la Planta Industrial Aceitera de Coto 54 donde se producen 5.000 toneladas métricas de residuo biomásico al mes en temporada baja y 11.000 toneladas métricas al mes en temporada alta.

El presente trabajo de investigación tuvo como finalidad evaluar la biodegradación de los residuos del procesamiento y extracción de aceite de *Elaeis guineensis* mediante una prueba piloto en la Planta Industrial Aceitera de Coto 54, para la aplicación de una tecnología de gestión del residuo.

La metodología empleada se dividió en tres fases, siendo la primera de ellas la fase líquida en donde se analizaron veinticuatro muestras de fibra de palma africana en medio GYM, de las cuales seis fueron inoculadas con *Trichoderma spp* y seis con el hongo *P. ostreatus*, se realizaron análisis de pH, temperatura, lignina, reducción de azúcares por medio de glucosa y análisis cualitativos por medio de fotografías para determinar la degradación de los ensayos. El pH de los ensayos inoculados con ostra llegó a ser el óptimo lográndose estabilizar, mientras que los valores de pH de *Trichoderma* fueron similares a los controles, en cuanto a los análisis de glucosa para el *P. ostreatus* disminuyó de 1000 ug/ml a 200 ug/ml al pasar 30 días, por su parte para el segundo hongo no se observó ninguna disminución marcada.

La fase dos correspondió a la fase sólida, en donde se utilizaron contenedores a las cuales se les aplicó tierra en una relación 1:3 al tamaño del alto del recipiente y se colocó la fibra la cual fue inoculada con el hongo *Trichoderma sp*, en dicha fase se realizaron análisis de pH, humedad, temperatura, análisis cualitativo y relación C/N. Las temperaturas alcanzadas para ensayos enterrados como para los que se encontraban en montículo con presencia del hongo se encontraron dentro del rango de 22-24°C, por su parte el porcentaje de humedad alcanzado en los ensayos en general fueron de 30-40%, en cuanto a la relación carbono nitrógeno se obtuvieron resultados menores de 25 para los ensayos enterrados, así como los expuestos en montículos.

En la tercera fase se realizó el ensayo en campo, en el cual se valoró el funcionamiento del hongo seleccionado siendo este el *P. ostreatus*, al exponerse a las condiciones propias del área de estudio se obtuvieron resultados lineales de pH los cuales se encontraron en un rango alcalino, mientras que la temperatura más alta alcanzada fue de 30,13°C para el ensayo sin adición de agua, tanto el ensayo en seco como el húmedo alcanzaron la temperatura óptima de crecimiento en la tercera y quinta semana, mientras que los porcentajes de humedad se encontraron entre 20-57%. Los ensayos en campo fueron invadidos por dos tipos de hongos identificados como *Comatus coprinus* y el *Neurospora crassa*.

Una vez que se completaron las fases establecidas del estudio, se evidencia tanto cualitativa y cuantitativamente que el microorganismo que representó una mayor afinidad para el aprovechamiento de las estructuras lignocelulósicas de los residuos de palma utilizados y obtuvo un desarrollo más cercano al óptimo corresponde al hongo ostra bajo condiciones controladas. Por su parte, el comportamiento de este una vez que se aplicó en campo, presentó mayores variaciones de los parámetros evaluados debido a la exposición de condiciones ambientales propias del área de estudio, las cuales redujeron su capacidad para degradar el residuo en el tiempo establecido en la prueba piloto.

Finalmente, a partir de las principales conclusiones se destaca la necesidad de profundizar e invertir en investigaciones que a partir de una tecnología ambiental de gestión de residuo solvente la problemática referente al manejo de los residuos agroindustriales a nivel nacional.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>15</b>
1.1. Antecedentes .....	15
1.2. Planteamiento del problema .....	16
1.3. Justificación.....	17
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
2.1. Objetivo General .....	19
2.2. Objetivos específicos.....	19
<b>3. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>20</b>
3.1. Producción Agrícola en Costa Rica .....	20
3.2. Cultivo de <i>Elaeis guineensis</i> .....	20
3.3. Situación actual del cultivo de palma africana en Costa Rica.....	21
3.3.1. Económico.....	22
3.3.2. Social.....	23
3.3.3. Ambiental .....	24
3.3.4. Mercado.....	24
3.3.5. Legislativo.....	25
3.4. Proceso de extracción de aceite.....	26
3.5. Características del residuo generado .....	28
3.6. Estrategias aplicadas para el manejo de residuos de la industria aceitera.....	30
3.7. Biotecnología .....	30
3.8. Microorganismos utilizados en el estudio .....	32
3.8.1. <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	33
3.8.2. <i>Trichoderma spp</i> .....	34
3.8.2.1. pH.....	35
3.8.2.2. Humedad .....	36
3.8.2.3. Temperatura .....	36
3.8.2.4. Necesidades nutricionales .....	36
<b>4. METODOLOGÍA .....</b>	<b>37</b>
4.1. Enfoque de la investigación .....	37
4.2. Alcance de la investigación.....	37
4.3. Diseño metodológico.....	37
4.4. Sitio de estudio .....	37

4.5.	Proceso Metodológico.....	38
4.5.1.	Fase I. Medio Líquido .....	38
4.5.1.1.	Selección de la muestra.....	38
4.5.1.2.	Recolección de la información.....	39
4.5.1.3.	Análisis de la información .....	41
4.5.1.3.1.	ANOVA.....	41
4.5.1.4.	Especificaciones del equipo a usar .....	42
4.5.1.5.	Metodología empleada en Fase 1.....	44
4.5.1.5.1.	Análisis de pH y temperatura .....	45
4.5.1.5.2.	Reducción de azúcares por medio de Glucosa .....	45
4.5.1.5.3.	Lignina.....	46
4.5.2.	Fase II: Medio Sólido .....	47
4.5.2.1.	Selección de la muestra.....	47
4.5.2.2.	Recolección de la información.....	47
4.5.2.3.	Análisis de la información .....	47
4.5.2.4.	Metodología Fase II .....	47
4.5.2.4.1.	Relación C/N .....	48
a.	Análisis Carbono.....	48
b.	Análisis Nitrógeno .....	49
4.5.2.5.	Análisis de pH, humedad y temperatura .....	49
4.5.3.	Fase III: Campo .....	50
4.5.3.1.	Selección de la muestra.....	50
4.5.3.2.	Recolección de la información.....	50
4.5.3.3.	Metodología por emplear en campo .....	50
4.5.3.3.1.	Aplicación de fibra con hongo Pleurotus. ....	50
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>52</b>
5.1.	Fase 1. Ensayos Medio líquido .....	52
5.1.1.	Análisis Cuantitativos .....	52
5.1.1.1.	pH.....	52
5.1.1.2.	Temperatura .....	53
5.1.1.3.	Actividad enzimática por Glucosa .....	54
5.1.1.4.	Análisis de lignina.....	55
5.1.1.5.	Análisis de Varianza Anova para los Datos Cualitativos .....	55
5.1.2.	Análisis cualitativos .....	56

5.1.2.1.	Codificación del desarrollo de los hongos.....	56
5.1.2.2.	Fotografías de los ensayos en medio GYM en conjunto con residuo.....	57
5.1.2.3.	Fotografías del ensayo inoculado con <i>Trichoderma spp</i> .....	58
5.1.2.4.	Fotografías del ensayo inoculado con <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	58
5.2.	Fase 2. Ensayos Medio sólido .....	59
5.2.1.	Análisis Cuantitativos .....	59
5.2.1.1.	pH .....	59
5.2.1.2.	Temperatura.....	60
5.2.1.3.	Humedad.....	61
5.2.1.4.	Relación C/N .....	62
5.2.2.	Análisis Cualitativos .....	65
5.2.2.1.	Fotografías de los ensayos en microcosmos.....	65
5.3.	Fase 3. Ensayos .....	66
5.3.1.	Análisis Cuantitativos .....	66
5.3.1.1.	pH.....	66
5.3.1.2.	Temperatura. ....	66
5.3.2.	Análisis Cualitativos. ....	69
5.3.2.1.	Fotografías.....	69
<b>6.</b>	<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>75</b>
6.1.	Fase 1. Resultados Ensayos Medio líquido.....	75
6.1.1.	Análisis Cuantitativos .....	75
6.1.1.1.	pH.....	75
6.1.1.2.	Temperatura .....	76
6.1.1.3.	Actividad enzimática por Glucosa.....	76
6.1.1.4.	Análisis de Lignina .....	77
6.1.2.	Análisis cualitativos .....	78
6.1.2.1.	Codificación y fotografías del desarrollo de los hongos.....	78
6.2.	Fase 2. Ensayos Medio sólido .....	79
6.2.1.	Análisis Cuantitativos .....	79
6.2.1.1.	pH.....	79
6.2.1.2.	Temperatura .....	80
6.2.1.3.	Humedad .....	81
6.2.1.4.	Relación C/N.....	82
6.2.2.	Análisis Cualitativos .....	84

	10
6.2.2.1. Fotografías .....	84
6.3. Fase 3. Prueba piloto en campo.....	84
6.3.1. Análisis Cuantitativos .....	84
6.3.1.1. pH.....	84
6.3.1.2. Temperatura .....	85
6.3.1.3. Humedad .....	86
6.3.2. Análisis Cualitativos .....	87
6.3.2.1. Fotografías .....	87
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>90</b>
<b>8. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>91</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>92</b>
<b>10. ANEXOS.....</b>	<b>101</b>

## Tabla de Cuadros

<b>Cuadro 1.</b> Leyes y Reglamentos relacionados a la Agroindustria. ....	25
<b>Cuadro 2.</b> Metodologías empleadas en la Fase I.....	39
<b>Cuadro 3.</b> Codificación de los niveles de presencia de los hongos. ....	40
<b>Cuadro 4.</b> Equipo utilizado en el presente estudio.....	42
<b>Cuadro 5.</b> Metodología empleada en medio sólido .....	47
<b>Cuadro 6.</b> Descripción de metodología por aplicar .....	50
<b>Cuadro 7.</b> Datos de pH promedios y desviación estándar (SD) obtenidos por ensayo.....	52
<b>Cuadro 8.</b> Datos de temperatura y desviación estándar (SD) obtenidos semanalmente. ....	53
<b>Cuadro 9.</b> Datos obtenidos de glucosa según análisis inicial e intermedio .....	54
<b>Cuadro 10.</b> Resultados de los análisis de lignina en la Fase II. ....	55
<b>Cuadro 11.</b> Resultados de Análisis Varianza. ....	55
<b>Cuadro 12.</b> Análisis del comportamiento de los controles del ensayo según semanas.....	56
<b>Cuadro 13.</b> Análisis del desarrollo de los hongos con el residuo según semanas. ....	56
<b>Cuadro 14.</b> Resultados de pH obtenidos en la fase II. ....	59
<b>Cuadro 15.</b> Resultados obtenidos de las mediciones de temperatura semanalmente. ....	60
<b>Cuadro 16.</b> Resultados de humedad obtenidos semanalmente. ....	61
<b>Cuadro 17.</b> Datos obtenidos de relación Carbono/Nitrógeno en cada ensayo.....	63
<b>Cuadro 18.</b> Resultado de pH obtenidos en la fase III .....	66
<b>Cuadro 19.</b> Resultados obtenidos de las mediciones de temperatura. ....	66
<b>Cuadro 20.</b> Resultados obtenidos de las mediciones de humedad.....	67
<b>Cuadro 21.</b> Resultados de Análisis de Varianza para la Fase III .....	68

### Tabla de Figuras

<b>Figura 1.</b> Diagrama de flujo del proceso de extracción de aceite de palma en la empresa. ....	28
<b>Figura 2.</b> Estructura de la celulosa .....	30
<b>Figura 3.</b> Muestras con fase oscura en condición enterrada y montículo con <i>P. ostreatus</i> . ....	32
<b>Figura 4.</b> Mapa de ubicación Compañía Industrial Aceitera Coto 54, Planta Coto. ....	38
<b>Figura 5.</b> Baño María utilizado para los análisis del presente estudio. ....	46
<b>Figura 6.</b> Ilustración de aplicación en campo. ....	51
<b>Figura 7.</b> Resultados obtenidos de pH del medio GYM con respecto a GRT y GRP. ....	53
<b>Figura 8.</b> Datos de temperatura obtenidos en medio GYM respecto a GRT Y GRP. ....	54
<b>Figura 9.</b> Gráfico obtenido de reducción de azúcares en medio GYM respecto GRT y GRP. ....	55
<b>Figura 10.</b> Ensayo GYM con residuo. A: Semana 2; B: Semana 8. ....	57
<b>Figura 11.</b> Ensayo GRT con menor presencia del hongo. A: Semana 2; B: Semana 8. ....	58
<b>Figura 12.</b> Ensayo GRT con mayor presencia del hongo. A: Semana 2; B: Semana 8. ....	58
<b>Figura 13.</b> Ensayo GRP con menor presencia del hongo. A:Semana 2; B:Semana 8. ....	58
<b>Figura 14.</b> Ensayo GRP con mayor presencia del hongo. A: Semana 2; B: Semana 8. ....	59
<b>Figura 15.</b> Resultados de pH obtenidos en la metodología en montículo, Fase II. ....	60
<b>Figura 16.</b> Resultados de pH obtenidos en la metodología enterrada, Fase II. ....	60
<b>Figura 17.</b> Datos de temperatura obtenidos según las mediciones semanales. ....	61
<b>Figura 18.</b> Datos obtenidos de Humedad semanalmente previo a la adición de agua. ....	62
<b>Figura 19.</b> Comparación de muestras con escasa luz (M1-E) y blanco (BE) ambas enterradas. .	62
<b>Figura 20.</b> Fotografías de <i>P. ostreatus</i> en montículo con ambiente cerrado, semanales. ....	63
<b>Figura 21.</b> Gráfico comparativo relación C/N en ensayos con la fibra enterrada y suelo con <i>Trichoderma</i> . ....	64
<b>Figura 22.</b> Gráfico comparativo relación C/N en ensayos con la fibra en montículos y suelo con <i>Trichoderma</i> . ....	64
<b>Figura 23.</b> Ensayo en medio sólido inoculado con <i>Trichoderma spp.</i> A: Semana 2; B: Semana 8 .....	65
<b>Figura 24.</b> Ensayo en medio sólido fibra sin microorganismo. A: Semana 2; B: Semana 8. ....	65
<b>Figura 25.</b> Gráfico de resultado de pH obtenidos en la fase III. ....	66
<b>Figura 26.</b> Gráfico de resultado de temperatura obtenidos en campo. ....	67
<b>Figura 27.</b> Gráfico de resultados de humedad obtenidos en campo. ....	68
<b>Figura 28.</b> Colocación de ensayos en campo bajo metodología seleccionada en el día 1. ....	69
<b>Figura 29.</b> Presencia del hongo <i>N. crassa</i> ensayo FPS en Semana 1. ....	69
<b>Figura 30.</b> Comparación de ensayos FBH y FBS en campo. ....	70
<b>Figura 31.</b> Ensayo FPH con menor presencia de <i>P. ostreatus</i> en campo. ....	71
<b>Figura 32.</b> Ensayo FPS con menor presencia de <i>P. ostreatus</i> en campo. ....	72
<b>Figura 33.</b> Ensayo FPH con mayor presencia de <i>P. ostreatus</i> en campo. ....	73
<b>Figura 34.</b> Ensayo FPS con mayor presencia de <i>P. ostreatus</i> en campo. ....	74

**Tabla de ecuaciones**

Ecuación 1. Lignina.....	46
Ecuación 2. Normalidad sal de Mohr.....	48
Ecuación 3. Cálculo de % de materia orgánica.....	48
Ecuación 4. Cálculo de % de Carbono.....	48
Ecuación 5. Cálculo de % Nitrógeno.....	49

**Tabla de ANEXOS**

ANEXOS 1. Selenito de Sodio .....	101
ANEXOS 2. Sulfato de cobre .....	101
ANEXOS 3. Ácido bórico 4% .....	101
ANEXOS 4. Indicador Shiro Tashiro .....	101
ANEXOS 5. Ácido sulfúrico 0,0200 N.....	101

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Antecedentes

El cultivo de *Elaeis guineensis* conocido comúnmente como palma aceitera o africana ha tomado un papel importante en el sector agroindustrial costarricense, debido a su aporte positivo en la economía agrícola después de la salida del cultivo del banano en los años ochenta (Chacón, González y Segura, 2016). Los procesos de iniciación del cultivo se desarrollaron en la década de los Cuarentas (40s) cuando la empresa transnacional United Fruit Company insertó la palma africana al mercado nacional, como un producto alternativo al banano, el cual se encontraba de baja; para el año 1952 la extensión de palma se encontraba en 4 000 hectáreas en el norte de la provincia de Puntarenas (mostrando una reducción considerable del cultivo de banano) y prolongándose hasta el año 1983 cuando se generó su resurgimiento (Beggs y Moore, 2013). La zona del Pacífico Sur es donde más se cultiva esta planta, siendo el cantón de Corredores en la provincia de Puntarenas el que presenta la mayor cantidad de siembra de palma aceitera con un 62,2% y un 78,3% de fincas productoras a nivel país (Chacón, Gonzáles y Segura, 2016). En el caso de Compañía Palma Tica este cuenta con un total de 12 500 ha reportadas para el año 2020.

En cuanto a la producción del cultivo, para el periodo 2014-2018, se alcanzó una tasa de crecimiento promedio de 7,2% siendo este un porcentaje alto con respecto a la problemática enfrentada por los productores, entre ellas la afectación del complejo sanitario conocido como Flecha seca el cual provoca la pudrición del cogollo (conocido en ecología como meristemo apical, brote o yema), afectando en el año 2015 el 15% del área sembrada. Ante la situación mencionada, se llevaron a cabo procesos de capacitación mediante prácticas agrícolas correctivas dirigidas a los agricultores lo que generó un incremento en el rendimiento de 17,9 toneladas de fruta fresca/ ha, y con ello un aumento en la producción de los años 2016 y 2017 (Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria, 2018).

Actualmente, Palma Tica S.A es la empresa donde se ubica la Planta Industrial Aceitera de Coto 54 y que encabeza la producción de aceite de palma a nivel nacional y regional, contando con el mayor porcentaje de hectáreas sembradas de palma africana del país (Venegas, Salazar, y Montero, 2013). Según el estudio previo realizado por Balladares y Flores (2018), el tratamiento actual que reciben los residuos una vez extraídos el aceite en la empresa corresponde a: proceso de molienda y prensado, aplicación de control químico, almacenamiento en terreno y finalmente disposición en campo.

Respecto al uso de los hongos a nivel nacional Rojas (2015), desarrolló un estudio de degradación en residuos agroindustriales de piña, por medio de un consorcio de hongos donde se encontraron *Trichoderma spp* y *Pleurotus ostreatus*; dicho estudio demostró una disminución de

43,9% en celulosa evidenciando afectación en las propiedades físicas del material analizado. Por otra parte, en el año 2018 se realizó una investigación evaluando la degradación del residuo de *Elaeis guineensis* por medio del hongo *Pleurotus ostreatus* en donde se evidenció a partir de los resultados obtenidos la degradación y colonización del hongo en el residuo (Balladares y Flores, 2018).

A nivel internacional, la especie *P. ostreatus* se ha estudiado como agente degradador de materiales lignocelulósicos y se ha analizado el crecimiento del hongo en residuos agroindustriales como rastrojo de maíz, lentejas, paja de cebada, trigo, bagazo de caña de azúcar y cáscaras de arroz (Hernández, Niño, y Ruilova, 2017). En cuanto al *Trichoderma spp*, estudios demuestran su capacidad de desgastar compuestos complejos como el almidón, pectina y celulosa (Gómez, 2017) así como de ser agente acelerador en el compostaje de residuos de palma africana (Naher, Shafawati y Siddiquee, 2017).

## 1.2. Planteamiento del problema

Primeramente, como parte del desarrollo de la investigación surgió la siguiente pregunta: ¿Es posible degradar los residuos del procesamiento y extracción de aceite de *Elaeis guineensis* mediante la aplicación de una tecnología ambiental a partir de un microorganismo?

Por consiguiente, el objeto de estudio radica en evaluar la degradación del residuo de palma africana a partir de dos especies de hongos: *Pleurotus ostreatus* y *Trichoderma spp*, mediante análisis previo de laboratorio a nivel de medio líquido, microcosmo y con el establecimiento de las mejores técnicas de aplicación observados durante los estudios previos para su aplicación en campo, sustentándose el proyecto bajo el concepto de biotecnología.

Por otra parte, debido a que las plantas extractoras de aceite de palma generan grandes cantidades de material biomásico, este es considerado como uno de los principales problemas en la empresa, puesto que la Ley para la Gestión Integral de Residuos N° 8839 (2010a), establece que es responsabilidad del generador el manejo integral y sostenible de los residuos.

Con respecto al ambiente y a la sociedad, estos se ven afectados por la proliferación de moscas (*Musa domestica* y *Stomoxys calcitrans*) y de roedores ya que se encuentran cerca de materia orgánica en descomposición (Gálvez, 2015), lo que contribuye al desarrollo de enfermedades en los alrededores si no se controlada adecuadamente. Además, existe afectación en

los suelos debido a que este tipo de residuos tiende a modificar sus propiedades y saturarlos por el alto contenido oleaginoso que se caracteriza en su composición.

En cuanto al campo político el tema presenta escasa información, los programas son pocos y desactualizados, por lo que es necesario realizar estudios y mejoras en el tema. Respecto a la parte técnica, la investigación cuenta con los requerimientos necesarios para desarrollarse, debido a la participación en el proyecto de la empresa productora, y el apoyo existente del Laboratorio de Hidrogeología y Manejo de Recursos Hídricos de la Universidad Nacional (LHMRH) en donde se cuenta con los instrumentos y materiales necesarios para la ejecución de los análisis.

En cuanto a la temporalidad el proyecto se llevó a cabo en los años 2019 y 2022, cabe destacar que el tiempo estimado se vio afectado debido a la pandemia que inició en el país en el año 2020, lo que atraso los procesos establecidos en el estudio.

### **1.3. Justificación**

La alta cantidad de residuos agroindustriales que se generan dentro de las industrias de palma aceitera forman parte de los principales aspectos que afecta en términos ambientales, según Shafawati y Siddiquee (2013), esta generación ronda los 100 millones de toneladas aproximadamente. Actualmente, existen pocas alternativas que brinden un uso adecuado de este tipo de residuos y es aquí donde radica la importancia de la investigación en la búsqueda y el aporte hacia una nueva tecnología beneficiosa con el ambiente, que brinde soluciones a las problemáticas en el tratamiento de los residuos de este sector de gran interés socioeconómico en Costa Rica.

Por otra parte, la aplicación de este tipo de tecnologías logra mitigar otros problemas importantes, como la generación de insectos las cuales son plagas de importancia médica y veterinaria que pueden transferir diversos patógenos y enfermedades a la población colindante (Merchán, 2015). Por ende, entre los beneficios más destacables de la investigación se encuentran el aporte en la mitigación de las plagas de mosca y roedores, reducciones en el uso de agroquímicos industriales, sostenibilidad ambiental, beneficios en condiciones de los suelos y una mejora en los procesos de la empresa; favoreciendo a la población, los animales, los trabajadores y la empresa integralmente.

En lo que respecta al tema de los recursos, se presentó viabilidad positiva en temas financiero y de material, ya que al partir de una prueba piloto el desarrollo y ejecución de la investigación fue a pequeña escala, dotada por recursos propios y material del LHMRH donde se

realizaron los análisis. En cuanto al recurso humano este de igual forma fue positivo ya que existió un interés y preparación por parte de las desarrolladoras y personas relacionadas al proyecto realizado. Por tanto, los recursos fueron alcanzables y brindaron la viabilidad necesaria para el cumplimiento de los objetivos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo General

- Evaluar la biodegradación de los residuos del procesamiento y extracción de aceite de *Elaeis guineensis* mediante una prueba piloto en la Planta Industrial Aceitera de Coto 54 para la aplicación de una tecnología de gestión del residuo.

### 2.2. Objetivos específicos

- Comparar la degradación de los residuos del procesamiento de *Elaeis guineensis* en la aplicación de los hongos *Trichoderma spp* y *Pleurotus ostreatus* por medio de una prueba in vitro para la selección del microorganismo más eficiente.
- Determinar la efectividad en microcosmos del hongo *Trichoderma spp* mediante pruebas químicas y físicas para la selección del microorganismo más adecuado en campo.
- Realizar una prueba piloto para la degradación de los residuos de palma aceitera mediante la aplicación en campo del microorganismo seleccionado.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1. Producción Agrícola en Costa Rica

Actualmente, la agricultura forma parte de las principales actividades que impulsan el crecimiento dentro de un país ya que interfiere en la labor representativa del sector primario y contribuye económicamente al desarrollo de los países por medio del aprovechamiento de los recursos naturales (Collahuazo y Guerrero, 2015). En el caso de Costa Rica, este sector es de importancia ya que forma parte de la economía nacional, donde según la Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria (2018) esta debe de contemplarse más allá del sector primario, abarcando también las relaciones que se mantienen con las industrias proveedoras de insumos, las actividades de transformación de productos agrícolas y con el sector servicios.

El campo agrícola a nivel nacional también posee una estructura dual, la cual se encuentra dividida entre un sector exportador que va de la mano con un sector tradicional con baja productividad que abastece principalmente al mercado doméstico (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2015). Dentro de los principales productos se encuentran las frutas frescas con un 39% de las exportaciones de cobertura agropecuaria y los productos agroindustriales como el café, el azúcar, los jarabes concentrados y el aceite de palma, que alcanzan más del 50 % de las exportaciones de este tipo. En cuanto al área dedicada a cultivos agrícolas (500 000 hectáreas aproximadamente) el 51 % son cultivos industriales, el 22 % frutas frescas, el 22 % granos básicos, el 2 % hortalizas y el 3 % raíces tropicales (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2014).

Por su parte, dentro de los cultivos principales se encuentran los del sector agroindustrial el cual se define por la FAO (2013), como el subconjunto del sector manufacturero que realiza el procesamiento de materias primas y productos intermedios agrícolas, forestales y pesqueros. Según la Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria (2019), la agroindustria durante el año 2018 abarcó un promedio de 254 823 hectáreas de área sembrada con este tipo de cultivos de los cuales, el café es el rubro más importante con 84 133 ha (18,4%), seguido del cultivo de palma aceitera con 76 910 ha (16,5%) y la caña de azúcar con 60 000 ha (12,9%).

A partir de lo anterior, es posible identificar que el papel del cultivo de palma africana a nivel nacional forma parte importante del desarrollo del sector y del país en general, por tanto, se debe de conocer las características de este cultivo.

#### 3.2. Cultivo de *Elaeis guineensis*

La Palma Africana o aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq) es una especie perenne, monocotiledónea perteneciente a la familia Arecaceae y de polimerización cruzada (Billotte, *et al*,

2014), existe una segunda especie del género *Elaeis*, conocida como Palma Aceitera Americana (*Elaeis oleifera*) donde los mismos Billotte, *et al*, 2014, mencionan que son originarias de la región amazónica de América del Sur, y ambas especies poseen 16 pares de cromosomas, lo que les permite hibridarse fácilmente.

Este cultivo es considerado permanente debido a que posee como principal característica la posibilidad de ser cosechada sin destruir la planta, la cual tiene un ciclo productivo que se extiende entre veinticinco y treinta años; además esta genera una fructificación constante por lo que se realiza cosechas de manera continua durante todo el año, variando según la edad de la planta y las condiciones climáticas en la que se desarrolle (Ganchozo y Huaraca, 2017).

Durante los procesos de cultivo de *Elaeis guineensis* es primordial realizar un manejo agronómico completo durante los tres primeros años, al comenzar el segundo año y continuamente a lo largo de su vida, una sola planta de palma produce inflorescencias estaminadas e inflorescencias pistiladas en ciclos sucesivos, que se generan en la axila de cada hoja. Dichas inflorescencias son de tipo racimo y pueden llegar a desarrollar entre 200 y 400 frutos. A partir del mes treinta se inicia el periodo de fructificación alcanzando su máxima producción entre los ocho y diez años (Olivero, Sierra y Sierra, 2017).

Estos frutos se encuentran compuesto por un mesocarpio, un endocarpio llamado caparazón y una semilla (Billotte, *et al*, 2014) los cuales deben de ser procesados en cuanto son cosechados, para evitar el aumento en el contenido de ácidos grasos libres que pueden crear afectaciones en la calidad del aceite, una vez procesados se obtiene tres productos de mayor interés comercial provenientes del racimo de la fruta los cuales son aceite del mesocarpio, aceite de almendra y la torta de palmiste (Olivero, Sierra y Sierra, 2017).

Usualmente, no todos los frutos de un racimo obtienen una maduración óptima en el mismo periodo, por lo cual es preciso establecer criterios que definan la época de cosecha. Procesar racimos inmaduros produce bajas considerables en la cantidad de extracción de aceite y mayor gasto energético debido al tiempo de esterilización, mientras que los racimos sobremaduros proporcionan una baja de cantidad y menor calidad de aceite aumentando el costo de producción (Ganchozo y Huaraca, 2017).

### **3.3. Situación actual del cultivo de palma africana en Costa Rica**

Las plantaciones de *E. guineensis* son clasificadas a nivel país como un cultivo industrial debido a su producción, este tipo de siembra mostró un aumento del 1,9% en el periodo 2010-2014, sobresaliendo la palma aceitera la cual obtuvo un crecimiento notorio del 9,43% por año, seguido del cultivo de caña de azúcar con 4,35% anual. (Ministerio de Agricultura y Ganadería,

2014). Según El Ministerio de Agricultura y Ganadería, durante el periodo 2010-2014 se evidenciaron aumentos significativos en el área sembrada de dicho cultivo, lo cual refleja la existencia de un mercado seguro por parte de la agroindustria nacional, un incremento en los precios internacionales y además una coordinación entre el MAG, la banca y el sector cooperativo.

La siembra de palma aceitera en Costa Rica registra una extensión de 66 419,7 ha, destacando el cantón de Corredores con 25 402,2 ha, seguido por Quepos con 11 355,4 ha y Golfito con 9 320,1 ha (INEC, 2015a). Además, dentro de las principales plantas procesadoras de palma africana en el país se encuentran Palma Tica S.A y Coopeagropal R.L como las mayores productoras de aceite. Por su parte la Compañía Industrial Aceitera Coto Cincuenta y Cuatro S. A, es la principal exportadora de aceite de *E. guineensis* perteneciente al Grupo Numar.

La empresa procesa la fruta en dos formas de aceite: crudo el cual es extraído de la pulpa del fruto fresco de palma y aceite de pulpa, encontrándose en la semilla o pulpa de la fruta, estas formas de aceite crudo son utilizados domésticamente para margarina, manteca vegetal, jabón y cosméticos y también son exportados a otros países, entre ellos México (Beggs y Moore, 2013). Palma Tica posee tres plantas extractoras de aceite en las zonas de Palo Seco, en Parrita; Naranja en Quepos y Coto 54, en Golfito siendo esta última la más grande y la única que cuenta con refinadora de aceite (Venegas, Salazar y Montero, 2013).

Como parte de la situación actual de la producción de palma aceitera es necesario tomar en cuenta los siguientes aspectos:

### **3.3.1. Económico**

Según Beggs y Moore (2013), la producción de *E. guineensis* es un atractivo para los agricultores de las zonas cercanas debido a su estabilidad económica y la falta de opciones competitivas dentro y fuera del sector agrícola, la tierra dedicada a otros cultivos alimenticios y pastizales probablemente serán reemplazados por el cultivo de palma de aceite, siendo este un cambio de tierra que genere incentivos económicos a los agricultores.

La industria de palma aceitera genera fuentes de empleo en las zonas donde se producen, de manera indirecta se generan de 8.000 a 30.000 empleos destinados para la producción de aceite en el país (Beggs y Moore, 2013) además se crean cargos ocasionales conocidos como coyoleros, los cuales se encargan de la recolección de fruta caída, si bien es una oferta limitada de mano de obra la población considera de gran beneficio estos empleos debido la tasa de pobreza y desempleo que enfrenta ya que la relación existente entre la mano de obra necesaria por extensión de tierra para el cultivo es de 1 trabajador por cada 10 ha de plantación (Abarca, 2015). Dicho cultivo proporciona un número de personas ocupadas correspondiente a 12.013, lo que la posiciona

en quinto lugar de cultivos que generan empleo directo, siendo el banano el mayor generador de empleo, seguido del café, piña y las hortalizas (Hernández, 2017).

Según el Ministerio de Agricultura y Ganadería para el año 2013 Costa Rica generó 1.100 millones de dólares en exportaciones de aceite de palma generando un porcentaje de participación de 2,5% (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2014). Tanto las exportaciones como la comercialización e industrialización de la producción de la palma son controladas por United Brand, por medio de sus subsidiarias en el país, la mayoría de la producción de palma a nivel nacional es procesada por tres plantas extractoras de aceite mencionadas anteriormente, propiedad de esta corporación, en cuanto al refinamiento del aceite para la fabricación de subproductos de consumo final, también se encuentra desarrollada en su mayoría por Grupo Numar, subsidiaria de la United Brand (Abarca,2015).

### **3.3.2. Social**

El residuo generado dentro de la industria aceitera trae consigo una serie de consecuencias que deben de ser controladas para evitar la generación de problemas secundarios. Según Barrera et. al (2020), las capas de racimos vacíos en el suelo pueden constituir un sustrato para diferentes plagas como: *Stomoxys calcitrans*, *Musca domestica*, roedores entre otros, poniendo en peligro la salud de animales y personas; por estos motivos es importante que durante la generación de residuos se mantenga un control adecuado de estas plagas debido a los problemas sanitarios y económicos que se producen y que pueden llegar a afectar los intereses colectivos.

Un ejemplo de esto se menciona en Velasco, Cruz, Ángel, Medina y Ramos (2019), las moscas hematófagas más importantes en el ganado son la mosca del establo *Stomoxys calcitrans* responsables de pérdidas significativas en la producción como también vectores eficientes de diferentes microorganismos, además causan efectos directos por la pérdida de sangre, alteraciones en el comportamiento y el bienestar de los animales, pérdida de energía, disminución de la producción de leche y aumento de peso, además de los gastos incurridos al aplicar medidas de control químicas, físicas o biológicas

Otra plaga que se debe de controlar es la *Musa domestica*, la cual juega un papel importante según Alsahhaf, Bahareth, Hijji, Osman y Saleh (2018) esta potencia la transmisión de muchos patógenos como el cólera, la fiebre tifoidea, el tracoma, la diarrea, la tuberculosis, la salmonela y la sedimentación intestinal; pertenecen a la familia *Muscidae* que es una de las más numerosas y difundidas en el mundo, se multiplican alrededor de las casas y sitios de recolección de basura y comida o materiales en descomposición.

### 3.3.3. Ambiental

La producción de *E. guineensis* brinda beneficios socioeconómicos en las zonas en donde se desarrolla, sin embargo, esta actividad enfrenta dificultades en cuanto al manejo de sus residuos biomásico, según Balladares y Flores (2018), los diferentes tratamientos realizados varían dependiendo de la empresa o la planta extractora de aceite, no obstante, a pesar de los esfuerzos realizados estos no brindan la eficiencia requerida. Entre las diferencias más significativas de los tratamientos utilizados son la textura del residuo, la utilización de productos químicos, las cantidades generadas y las instalaciones empleadas para el tratamiento. Por otra parte, en el diagnóstico realizado durante el 2018 en la empresa Palma Tica S.A, se evidenció que el tratamiento aplicado en los residuos del procesamiento y extracción del aceite de palma conlleva primeramente un proceso de molienda y prensado que genera un residuo triturado, en segundo lugar se añade Starycide como control químico para disminuir la proliferación de moscas, como tercer paso este residuo es depositado en las instalaciones tipo invernadero de la empresa en donde se almacenan por un periodo de cincuenta y cinco días y finalmente, estos son dispuestos en los terrenos de la empresa específicamente en los alrededores de las plantaciones.

Por consiguiente, una de las principales problemáticas a tratar dentro de la industria extractora de aceite corresponde a la alta generación de residuos agroindustriales procedentes de los procesos productivos, esto porque en la Planta Industrial Aceitera de Coto 54 se producen 5.000 toneladas métricas de residuo biomásico al mes en temporada baja y 11.000 toneladas métricas al mes en temporada alta (Balladares y Flores, 2018) siendo cifras importantes que requieren de tratamiento adecuado para su control.

A partir de los enfoques mencionados, es posible considerar el concepto de triple utilidad (triple bottom line en inglés) dentro de la búsqueda soluciones entre ellas la que se plantea dentro del proyecto, debido a que este modelo de concepto consiste en equilibrar los componentes económico, social y ambiental en actividades propias del ecosistema empresarial (Caballero, Martínez y Pedraza, 2018). Además, su aplicación se basa en un balance de los tres enfoques a través de una gestión adecuada como requisito que permita considerar la búsqueda del desarrollo sustentable por parte de la empresa (Contreras, Martínez y Pedraza, 2017), esto a partir de la aplicación de descomponedores biológicos del residuo. Por tanto, una gestión adecuada de estos temas brinda un impacto social y ambiental positivo acompañado por un beneficio económico en la empresa.

### 3.3.4. Mercado

Debido a su versatilidad y su empleo para la elaboración de diversos productos el aceite de palma constituye la producción mundial anual más alta de aceite vegetal, con 53.3 Mt (toneladas métricas), seguido por el aceite de soya con 43.4 Mt y el aceite de colza 23.5 Mt, siendo 10 veces

mayor la productividad de aceite de palma africana en comparación con la soja, con un rendimiento de 7,5 a 9 toneladas de aceite/año/ha en condiciones climáticas favorables (Billotte, *et al*, 2014).

La demanda de aceites vegetales se dividen en dos aplicaciones principales: la industria alimentaria y la industria química, siendo más de 80% del aceite destinado a la primera , por otra parte debido al interés por las fuentes de energía renovable que se ha generado en los últimos años los cultivos oleaginosos como la palma de aceite, la soja y la colza comenzaron a ser utilizados como fuentes para le generación de combustibles como lo es el biodiesel lo que ha diversificado su utilización (Billotte, *et al*, 2014).

A nivel país existen dos empresas líderes en el procesamiento de aceite de palma como se mencionó anteriormente, estas industrias en términos de distribución en el mercado destinan un 65 % del producto al extranjero y 35 % se queda en el país para consumo interno, donde el 64% corresponde a manteca, 13 % se elabora en margarina, 10.5 % para aceites y 12.5 % en otros procesos de elaboración de productos (Universidad Estatal a Distancia, 2015). Dentro del país el principal mercado para la palma africana son los aceites comestibles, si bien los precios del aceite crudo varían constantemente en el mercado la demanda no varía al ser visto por los consumidores como un bien necesario dentro de la canasta básica (Beggs y Moore, 2013).

### 3.3.5. Legislativo

A nivel legislativo existen ciertos reglamentos y leyes que orientan a las empresas agroindustriales a mejorar sus procesos y a disminuir los efectos negativos que estos puedan generar tanto al ambiente como a la sociedad, el sector palmero se rige de una serie de normas nacionales para el desarrollo de su producción (Ver Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Leyes y Reglamentos relacionados a la Agroindustria.

Aspecto	Norma
Salud	Ley Orgánica del Ambiente N.º 7554 de 1995. Ley General de Salud N.º 5395 de 1974.

---

	Ley de Protección Fitosanitaria N° 7664 de 1997.
Ambiente	Ley para la Gestión Integral de los Residuos Sólidos N.º 8839 de 2010(a). Ley de Aguas N.º 276 de 1942. Reglamento de Vertido y Reúso de aguas N° 33601 de 2007
Económico	Ley del Sistema de Banca para el Desarrollo N.º 8634 de 2008. Reglamento a la Ley Apoyo y Fortalecimiento del Sector Agrícola N°36173 2010(b).

---

Fuente: Asamblea, legislativa, 2019.

Si bien las normativas sirven como respaldo al cumplimiento de parámetros establecidos, la agroindustria debe de tomar en cuenta además de su producción e impacto económico mundial, la relevancia de ser reconocida por los procesos que se implementen para disminuir el impacto ambiental generados por sus residuos, por lo cual la permanencia y competitividad de las mismas en el mercado no va a depender solamente de reglamentaciones y leyes sujetas a sanciones sino también de su relación con el ambiente (Peñaranda, Montenegro y Giraldo, 2017).

La gestión de los residuos de palma africana se debe de enfocar en un tratamiento final de los mismos por medio del aprovechamiento de estos de manera que generen valor agregado a la empresa, siendo la tecnología limpia una estrategia viable, que busca generar reducción en los impactos al ambiente, optimizando los procesos y materiales

### **3.4. Proceso de extracción de aceite**

Según el Diagnóstico realizado por Balladares y Flores (2018), el proceso de extracción de aceite en la empresa Palma Tica S.A conlleva una serie de etapas importantes para la obtención del producto final, donde primeramente se da el ingreso de los camiones provenientes del campo con los racimos de fruta a la planta industrial aceitera, a partir de este momento se procede a realizar un proceso de registro y pesaje (entrada y salida del camión transportador) por medio de una romana, seguidamente los racimos son depositados en el área de descarga en donde la fruta pasa al llenado de canastas por medio de una banda transportadora, hasta llegar a un autoclave donde esta es esterilizada por una hora y treinta minutos a 150° C para la eliminación de bacterias y microorganismos; la fruta con el pinzote pasa por una desfrutadora en donde es desgranada y se separa la tusa (racimo vacío) del coyol (exocarpio), los racimos vacíos son transportados por medio

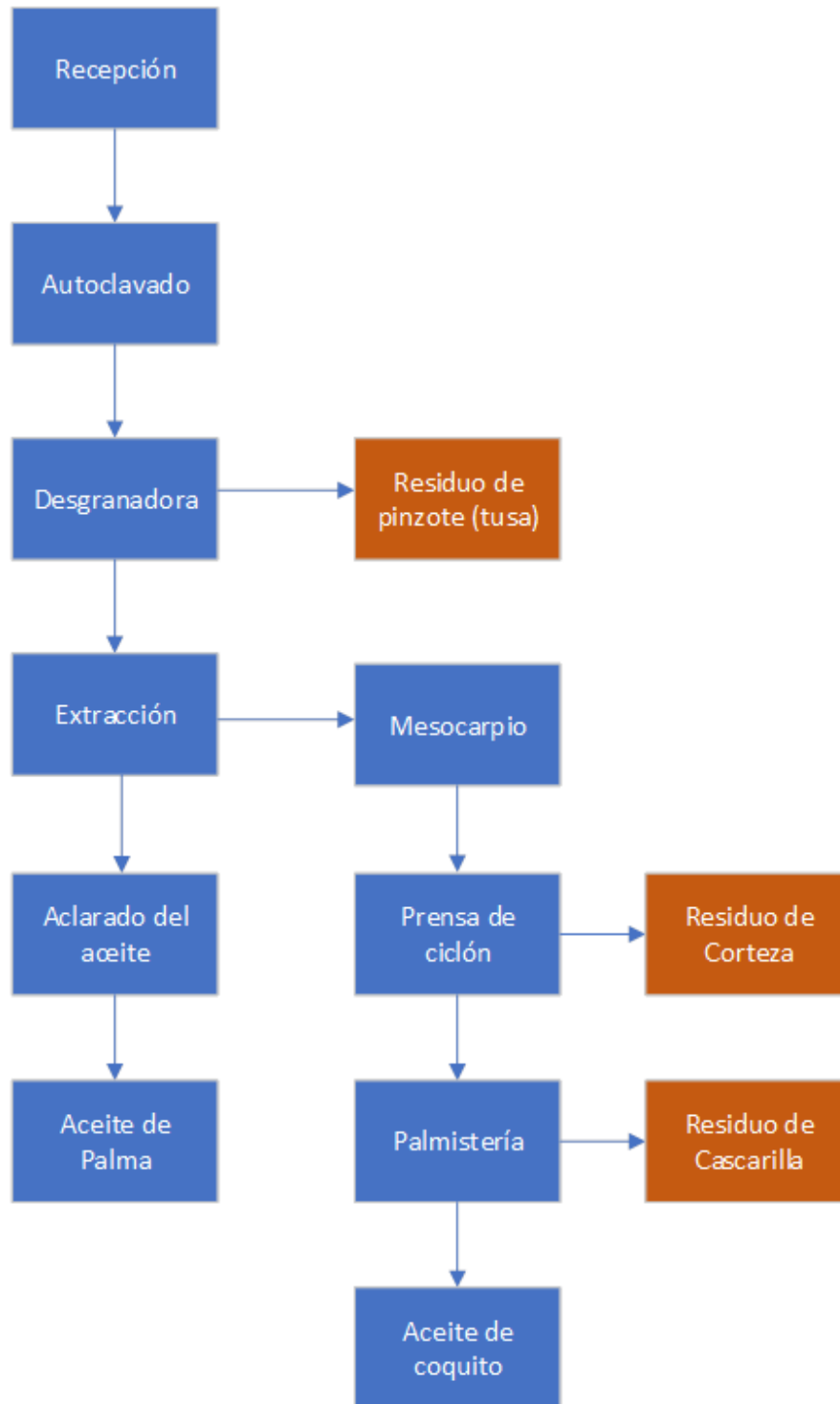
de una banda en donde se va verificando que la cocción sea la adecuada; cabe destacar que la materia prima que se encuentra cruda o verde se devuelve al proceso de esterilización una vez realizado el chequeo de cocción la fruta que cumple con las características adecuadas pasa a un molino para la respectiva extracción de aceite. El coyol (exocarpio) obtenido en la etapa anterior sigue hacia la prensa en donde se le da la primera extracción de aceite, después de esto se obtiene dos productos: la fibra del mesocarpio y el aceite, este último es transportado por digestores al proceso de aclarado.

Mediante una bomba, el aceite crudo entra a  $5 \text{ m}^3/\text{h}$  al proceso de blanqueado en donde se le agrega 1000 ppm de ácido cítrico cada 258 segundos, posteriormente pasa por un intercambiador de calor para seguir a un tanque en donde se le adiciona 0,60% de tierra blanqueante y el aceite pasa por un mezclador con agitación; mediante una bomba este ingresa hasta los filtros niágara en donde queda atrapada la tierra y sale el aceite limpio, pasando después por el filtro pulidor en donde las partículas de tierra que atravesaron el primero quedan atrapadas, para ser enfriado por medio de un intercambiador de agua, finalmente realizan pruebas de color siendo 5 el máximo permisible para el comercio.

Los residuos de fibra de pinzote generados durante el proceso de extracción son llevados al campo y compostera mediante vagonetas con una dosis previa de Starycide en una proporción de 1.300 mL diluido en 1.000 L de agua para el control de las moscas. El residuo del mesocarpio generado en la prensa pasa por ciclones que separan la fibra de la semilla o nuez (endocarpio), la primera es usada en las calderas y la cantidad sobrante se lleva al área de compost. La semilla (endocarpio) pasa a un ciclón de cascarilla que separa el coquito de su corteza, donde seguidamente inicia el proceso de palmistería que realiza la molienda del coquito (endosperma), esta materia prima pasa por un tamiz para refinar la harina, la cual actualmente es vendida a la industria animal. (Ver Figura 1).

Todo este proceso mencionado da origen a grandes cantidades de residuo generado el cual debe de ser tratado, para ello es fundamental conocer las características de este, su composición y de esta manera tener claro el método para actuar.

**Figura 1.** Diagrama de flujo del proceso de extracción de aceite de palma en la empresa.



### 3.5. Características del residuo generado

Parte de las problemáticas existentes en la industria de aceite de palma es la falta de estrategias adecuadas para el manejo y disposición de los residuos del fruto o fibra, ya que dentro de esta se generan grandes cantidades de residuos sólidos, no sólo durante el proceso de extracción sino durante el proceso de corte y cosecha, los cuales aquejan a los encargados de su

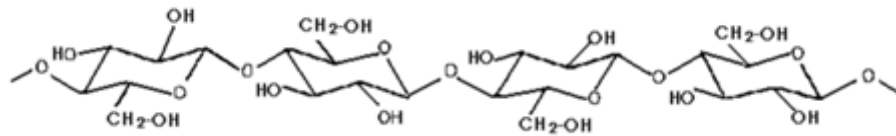
disposición porque su degradación es muy lenta, su olor es fuerte, se generan otros impactos secundarios como pérdida de las condiciones óptimas y por ende la saturación de los suelos así como problemas con la proliferación de dos tipos de mosca conocidas comúnmente como mosca de establo y mosca doméstica, debido a la remanencia de nutrientes y aceites que contienen y que generan condiciones extraíbles para estos insectos siendo un alimento fácilmente soluble a las secreciones salivales de los mismos (De Paz Santizo, 2014).

Dentro de los residuos generados en los procesos de obtención del aceite de palma se encuentra el raquis, el cual forma parte en un 26 % de la tusa o racimo vacío del fruto, la disposición de este normalmente se realiza en campo lo que provoca la inmovilización de nutrientes, anaerobiosis, atracción de roedores e insectos, además de la producción de lixiviados (Benavides, Cabrera y Villota, 2015). Por otra parte, también se cuenta con el residuo de tusa o racimo vacío de palma, este está compuesto por materiales lignocelulósicos con 60 a 65% de humedad y de 1 a 2,5% de aceite vegetal impregnado por los procesos de desfrutado en los que se da una separación física de los frutos del raquis, además la tusa contiene K, N, P y Mg en menor proporción, así como polisacáridos entre ellos celulosa, glucano y xilano, en aproximadamente 66%, y polímeros, como la lignina, en 12% (Garzón, Ramírez, Silva y Yáñez, 2011).

Una de las principales causantes de la lenta degradación de estos residuos corresponde a la lignina la cual es considerada como una molécula insoluble en agua, altamente ramificada, con una matriz que encapsula a las moléculas de celulosa, lo que impide su degradación en poco tiempo, aunado con el grado de polimerización, el área de superficie disponible y el contenido de humedad (Martínez, 2014), generando problemas en cuanto a su adecuado tratamiento.

Además, estos residuos presentan la característica de estar conformados por lignocelulosa es decir, hebras de celulosa, unidas sobre una matriz de hemicelulosa y lignina, donde la molécula de celulosa se forma a partir de largas cadenas lineales, de entre 2.000 y 25.000 moléculas de D-glucosa, unidas a través de un enlace glucosídico  $\beta$ 1,4 (Martínez, 2014); siendo también la celulosa, un componente principal de los tejidos vegetales y base estructural de los mismos; donde según Abril (2016) su cadena es alargada con unidades de glucosa dispuestas en un solo plano por la presencia del anillo glicosídico, unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals (Ver Figura 2) que también impiden su rápida descomposición.

**Figura 2.** Estructura de la celulosa. Fuente: Abril, 2016.



Dentro de las principales desventajas que presentan estos residuos generados por el sector palmicultor se encuentran elevada carga orgánica y elevado volumen de generación, impactos ambientales como malos olores, generación de gases de efecto invernadero, percolación de lixiviados, pérdida de las propiedades de los suelos, plagas, entre otros; motivo por el cual se deben de emplear e investigar soluciones que impidan los impactos mediante la aplicación de métodos o estrategias de gestión que permitan proteger el ambiente, sin comprometer la viabilidad económica del sector productivo involucrado, potenciando el desarrollo sostenible dentro del sector (Serrano, 2015).

### **3.6. Estrategias aplicadas para el manejo de residuos de la industria aceitera**

Dentro de la literatura se mencionan diferentes usos que se le pueden brindar a los residuos que se generan en las industrias procesadoras entre ellos se encuentran la reutilización de los subproductos como la ceniza que es utilizada en procesos de construcción, las tierras blanqueantes y harina de coquito utilizadas en concentrados para alimentos, recuperación de aceites y producción de cementos y ladrillos, asfaltos de camino, tratamiento de aguas residuales, fabricación de jabones y producción de papel (Balladares y Flores, 2018).

Sin embargo, el residuo de la fibra de pinzote carece de estrategias que brinden un manejo adecuado para su disposición en campo. Mejías, Orozco y Galán (2016), mencionan en su investigación que estos residuos de tipo agroindustrial dependiendo de su origen y de su composición pueden ser reutilizados para generar productos para el consumo humano y animal, producción de energías renovables, obtención de biocombustibles y algunos productos químicos, así como recuperadores de la tierra o abonos. Para efectos de la presente investigación, se evaluará la aplicación de una tecnología limpia para la gestión de este tipo de residuos mediante el uso de biotecnología ambiental referida a la búsqueda de la degradación del residuo a partir de microorganismos especializados en la descomposición de residuos lignocelulósicos.

### **3.7. Biotecnología**

Este tipo de biotecnología se refiere según su concepto a la implementación de la ciencia en conjunto con la tecnología y sus facultades de manera que posibiliten el manejo de los

organismos vivos, sus partes y modelos de esos organismos para de esta manera poder modificar materiales vivos o no vivos para la generación de conocimiento, bienes o servicios dirigiéndose cada vez más a la búsqueda de soluciones a problemas ambientales en los factores relacionados con el agua, suelo y aire, siendo la biorremediación uno de los más utilizados aportando organismos con capacidades de reutilizar, inactivar o eliminar residuos tóxicos y disminuir su afectación al ambiente (Benavides, Cabrera y Villota, 2015).

Entre las aplicaciones biotecnológicas para el manejo de residuos agroindustriales se cuenta con el uso de microorganismos en el tratamiento y reutilización de estos donde según Rojas (2015) en estos sistemas de producción agrícola los residuos son dejados sobre la superficie, estimulando el desarrollo y la actividad de los microorganismos para su tratamiento. Como parte de los microorganismos que se han utilizado dentro de diferentes investigaciones para el tratamiento y conversión de residuos agroindustriales en productos de valor agregado se encuentran diferentes tipos de levaduras, bacterias y hongos (Mejías, Orozco y Galán, 2016). Entre los tipos de bacterias utilizadas se encuentran las de los géneros *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Citrobacter* y *Stenotrophomona*. Por su parte, los tipos de hongos empleados son los filamentosos como *Aspergillus* y *Penicillium*, así como el *Trichoderma* y el hongo comestible *Pleurotus ostreatus* (Rojas, 2015).

Diferentes autores plantean el uso de estos microorganismos como sustratos o fuentes de obtención de enzimas entre ellos se encuentran los investigados por Mejías, Orozco y Galán (2016) como parte de tecnologías ambientales de tratamiento y/o aprovechamiento de residuos agroindustriales entre ellas:

1. Obtención de enzimas celulosa y pectinasas para usos en industria textil, química y de alimentos a partir de desechos de uva pomace mediante el uso de cepas de *Aspergillus awamori*.
2. Obtención de enzimas utilizadas para la fabricación de pastas, harina de trigo como aditivo en alimentos de aves de corral y procesos de blanqueo en la industria química mediante los desechos de bagazo de caña, avena, salvado de trigo, residuos de cebada y cáscaras de yuca como sustrato aplicando cepas de *Penicillium janczewskii*.
3. Degradación de residuos de la industria vinícola mediante el uso de hongos como *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes hirsuta*, *Lactobacillus spp.*, *Pleurotus spp.* y *Aerobasidium pullulans*.

En cuanto a estudios realizados a nivel nacional, Rojas (2015), utilizó un consorcio microbiano constituido por bacterias y hongos incluyendo *Trichoderma* y *Pleurotus ostreatus*

sobre residuos de piña, logrando una degradación del 43.9% de la celulosa del material y monitoreando la actividad enzimática del consorcio por medio de la glucosidasa, celobiohidrolasa y xilanasa. Por su parte Balladares y Flores (2018) realizaron un estudio a nivel de laboratorio en el cual se muestra un crecimiento del hongo ostra a partir de una metodología denominada microcosmos en la cual fue posible evidenciar un crecimiento micelial efectivo y una degradación percibida por las condiciones y cambios generados en el residuo de fibra de pinzote de palma africana, en dicha investigación se observó la colonización del hongo en el sustrato siendo este su fuente de carbono, alimentándose del mismo y logrando su desarrollo mediante la aplicación de la metodología en fase oscura del hongo en un periodo de 8 semanas (Ver Figura 3).

**Figura 3.** Muestras con fase oscura en condición enterrada y montículo con *P. ostreatus*.

A: fibra enterrada con hongo; B: Fibra en montículo con hongo



### 3.8. Microorganismos utilizados en el estudio

Dentro de la investigación se planteó la utilización de los hongos denominados *Pleurotus ostreatus* y *Trichoderma spp.* Estos microorganismos presentan las generalidades de pertenecer al reino Fungi, ser organismos vivos caracterizados por ser inmóviles y por requerir compuestos orgánicos de otros organismos (ya sean animales, plantas, otros hongos, bacterias y en este caso residuos agroindustriales) para su alimentación, considerándose dentro de la clasificación de heterótrofos. Además, son capaces de degradar la celulosa y la lignina que solamente algunas bacterias son capaces de descomponer presentando ventaja sobre las mismas. Entre sus funciones especiales se encuentran su contribución al equilibrio ecológico y funciones ecosistémicas entre ellas: degradación y reciclaje de material orgánico muerto, almacenamiento de agua, crecimiento de plantas, limpieza de agua y alimento para animales además de que atacan los sustratos y permiten biodegradar los mismos (Cáceres, López y Piepenbring, 2016).

Aunado a lo anterior, los hongos contribuyen en la aplicación de procesos biotecnológicos al ser organismos que generan diversos beneficios como su potencial en el control biológico y la

producción de varias enzimas (Gómez, 2017) que permiten la degradación total de componentes químicos y estructurales. Cabe destacar que los residuos generados por las agroindustrias, así como lo vegetales representan un sustrato idóneo para el crecimiento fúngico, ya que están constituidos por polímeros que difícilmente pueden ser degradados por la mayoría de los otros microorganismos presentes en el ecosistema dentro de ellos la lignina mencionada anteriormente. Esta, además, se caracteriza por ser un heteropolímero muy recalcitrante que es transformado por pocas bacterias, sin embargo, puede ser transformada más abiertamente por grupos de hongos que contengan enzimas como las ligninas peroxidasas, el manganeso peroxidasas y lacasa (Martínez, 2014) como los presentes en el estudio.

### **3.8.1. *Pleurotus ostreatus***

Es un hongo que pertenece al grupo de los Basidiomicetos, es de pudrición blanca, se le conoce comúnmente como hongo ostra y dentro de las características principales mencionadas en la mayoría de la literatura se encuentra su capacidad de producir enzimas que degradan eficientemente la celulosa (celulasas), la hemicelulosa (hemicelulasas) y la lignina (oxidoreductasas, lacasas, peroxidasas y oxidasas) en compuestos de bajo peso molecular que pueden ser asimilados por estos organismos. El objetivo principal de la degradación de la lignina por parte del microorganismo es romper los enlaces que interfieren el paso hacia la celulosa y hemicelulosa las cuales representarían su fuente de carbono y energía para producirse en el sustrato o ambiente (Agüero, Buglione, Filippi, Martínez y Rodríguez, 2018; Ahuactzin et. al, 2018). Además, se debe destacar que de los tres polímeros mencionados el más resistente es la celulosa, por lo cual este se degrada en menor cantidad frente a los otros dos (Alonso, Domínguez, Parajó, Romani y Yáñez, 2014).

Por otra parte, estos microorganismos de pudrición blanca son considerados como descomponedores primarios porque son capaces de utilizar los desechos agrícolas en su forma original sin ningún tratamiento previo de degradación bioquímico o microbiológico (Agüero, Buglione, Filippi, Martínez y Rodríguez, 2018). También los mismos autores mencionan que al ser estos organismos heterótrofos, se nutren a partir de los compuestos orgánicos e inorgánicos que contenga el sustrato, en el caso de los residuos agroindustriales estos tienen un uso positivo en la producción de hongos comestibles al brindar las fuentes de carbono, nitrógeno, azufre y fósforo necesarias para el desarrollo adecuado de la biomasa fúngica.

Castro, Bustamante y García (2016), indican que diferentes estudios reportan la bioconversión de residuos agroindustriales e industriales, empleando este hongo comestible en

sustratos como: desechos de cultivos de maíz, ajo, caña, aceite de oliva, arroz y fibras de planta; además de sobrantes de la industria maderera, papelería y de biodiesel concordando con Aguas *et.al.* (2017), que afirman que utilizar materiales que contengan una composición similar a la que el hongo utiliza para crecer en su ambiente natural como los residuos agroindustriales es posible, además de que se generaría una solución vital a estos tipos de residuos que en la mayoría de los casos no son reutilizados sino simplemente son quemados o arrojados a los basureros, quebradas y ríos, sin tratamiento previo, contribuyendo de esta manera al daño del ecosistema.

En Latinoamérica, el cultivo del hongo ostra brinda alternativas respecto a los otros hongos comestibles siendo una producción que no genera contaminantes como residuos y es de bajo costo. Estos cultivos se sustentan en el aprovechamiento de los subproductos agrícolas de una determinada región, como lo son la paja de trigo, maíz, sorgo, arroz, avena, entre otros, con el fin de generar un producto alimenticio que aparte de ser una tecnología fácil de implementar puede convertirse en una fuente secundaria de ingresos. Entre las ventajas del cultivo de *P. ostreatus* se encuentran que no se necesitan productos químicos, el sustrato residual después de su producción puede ser utilizado como abono orgánico en los mismos cultivos y también la conservación y mejora de la calidad de los suelos (Aceves *et. al.*, 2015). También Agüero, Buglione, Filippi, Martínez y Rodríguez (2018) indican otros beneficios como su factibilidad en la calidad organoléptica y propiedades nutraceuticas de los cuerpos fructíferos.

Para el caso del presente estudio y como se menciona anteriormente el hongo ostra puede ser cultivado sobre una variedad de sustratos orgánicos y según Damilare, Gbemisola, Gbolagade, y Kehinde (2018), los residuos provenientes de la extracción de aceite no son la excepción ya que estos tienen la capacidad de cultivar y aprovechar sus nutrientes siendo una estrategia favorable para tratar los mismos. De igual forma, Benavides, Cabrera y Villota (2015), indican que el uso de estos hongos es considerado como alternativas de producción mediante alimentos funcionales con un alto contenido de ácidos grasos insaturados, además de que generan una posibilidad viable de tratamiento de dichos residuos desde el criterio ambiental.

### **3.8.2. *Trichoderma spp***

El género *Trichoderma spp* es un hongo ampliamente estudiado, Según Acosta, (2015) este es perteneciente al reino Mycetae (hongos verdaderos) de la división Eumycota, subdivisión Deuteromycotina, clase Hyphomycetes, orden Hyphales (Moniliales) y familia Moniliaceae. El *Trichoderma* en su estado vegetativo presenta hifas septadas, las especies son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucano, su reproducción se realiza de manera asexual por medio de conidios de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro, usualmente ovalados, unicelulares y coloreados comúnmente

verde con variaciones amarillas. Así mismo tienen la capacidad de producir clamidosporas unicelulares logrando en ocasiones unirse, dichas estructuras son de vital importancia para el organismo los cuales son producidos bajo condiciones de estrés (Gómez, 2017).

Infante, Martínez y Pereira, (2015) mencionan que una de la principales características del microorganismo es ser un hongo saprófito de crecimiento rápido, que logra distribuirse en diferentes latitudes y ambientes, además conserva la habilidad de sobrevivir en suelos que contengan diversas proporciones de materia orgánica debido a la característica de descomponerla, así mismo puede ser anaerobio facultativo en determinadas condiciones, lo anterior le proporciona al organismo una mayor plasticidad ecológica logrando que este soporte variaciones de los factores limitativos lo que se relaciona directamente con la alta capacidad enzimática, siendo un organismo versátil y resistente a inhibidores microbianos.

La capacidad enzimática que posee el hongo se debe a su variedad hidrolítica, dentro de ellas se puede mencionar las amilasas, pectinasas, celulasas y quitinasas entre otras, a lo que se le atribuye su capacidad de degradar compuestos complejos como el almidón, pectina y celulosa, hemicelulosa y lignina (Gómez, 2017). Dicha especie se ha utilizado como agente de control biológico, por su competitividad en cuanto a espacio y nutrientes, también produce toxinas contra los hongos fitopatógenos (Nugra,2018).

Las sustancias orgánicas que contienen alto contenido de lignina y celulosa generan una lenta degradabilidad microbiana. Por lo que, la adición de hongos aceleradores, como la especie *Trichoderma*, promueve el proceso de degradación y en compost mejora las propiedades físicas, como la capacidad de retención de agua, la aireación y la textura, en estudios realizados en compost se ha evidenciado la aceleración en tan solo un mes del mismo después de ser inoculado con hongos celulolíticos como *Aspergillus* y *Trichoderma*, así mismo se demostró que al comparar el compost inoculado con *Trichoderma* con un blanco, el inoculado redujo el tiempo de maduración en un 60,9% (Shafawati, Siddiquee y Naher, 2017).

Como se menciona anteriormente, el hongo tiene una capacidad de sobrevivir en medios con condiciones varias, según Siddiquee, Shafawati y Naher (2017), es fundamental tener un control y conocer los rangos aceptables de los parámetros físicos-químicos que intervienen en el crecimiento del hongo, de los cuales menciona:

#### **3.8.2.1. pH**

Este es un parámetro crítico en la viabilidad del hongo, el pH óptimo para la degradación de la celulosa y la lignina por hongos es de 4, debido a que estimula las actividades enzimáticas, aunque muchas de las especies del género pueden crecer en un amplio rango de pH de 2,0-6,0.

### **3.8.2.2. Humedad**

El *Trichoderma spp.* presenta bajo nivel de tolerancia osmótica, un exceso de humedad baja la disponibilidad de oxígeno, limitando desarrollo del hongo, y compacta el sustrato impidiendo su colonización total. Por otro lado, una baja humedad inhibe el desarrollo del hongo al no permitir la movilidad de nutrientes en solución y secar el micelio, el hongo puede crecer en un rango de humedad del medio del 30 al 75 %.

### **3.8.2.3. Temperatura**

Para el desarrollo de la biomasa fúngica se ha encontrado que el *Trichoderma spp* puede desarrollarse en un rango de temperatura de 10-40 °C, fuera de este rango puede ocurrir desnaturalización de proteínas, inhibición de enzimas, supresión o promoción de metabolitos, pérdida de viabilidad y muerte celular. Por otro lado, la temperatura óptima de crecimiento depende de la especie.

### **3.8.2.4. Necesidades nutricionales**

Por otra parte Gómez (2017), menciona que las necesidades nutricionales de *Trichoderma spp* son poco exigentes debido a que sus requerimientos en cuanto a microelementos, sales y vitaminas son bajos, por otro lado las fuentes de nitrógeno que puede consumir es muy variado ya que puede asimilar diferentes compuestos nitrogenados como aminoácidos, urea, nitritos, amoniac y sulfato, durante el proceso de formación de esporas el nitrógeno resulta ser el factor limitante mientras que la fuente de carbono presente en el sustrato es el reactivo en exceso. La relación C/N es relevante para el hongo ya que de este balance dependerá la formación de las esporas deseadas, usualmente se utilizan compuestos procedentes de la agricultura o subproductos de la agroindustria debido a que suplen la demanda de nutrientes requeridos por los microorganismos a un bajo costo.

La aplicación de estos tipos de microorganismos como una tecnología limpia en residuos agroindustriales y en el caso específico de palma, contribuye una herramienta viable para la disminución de los impactos generados por la industria proporcionando una posible solución amigable con el ambiente.

## **4. METODOLOGÍA**

### **4.1. Enfoque de la investigación**

La investigación se realizó bajo un enfoque de tipo mixto debido a que en el desarrollo de la misma se contó con características cuantitativas y cualitativas; según Guelmes y Nieto (2015), lo cuantitativo hace referencia a la posibilidad de contestar preguntas relacionadas a la investigación y confiar en la medición numérica y la estadística, mediante la recolección y el análisis de datos para el establecimiento de patrones de comportamiento exactos; mientras que lo cualitativo reconoce la posibilidad de contestar y refinar preguntas de investigación mediante métodos de recolección de datos sin medición numérica, como las descripciones y las observaciones.

### **4.2. Alcance de la investigación**

El alcance de la investigación se catalogó como exploratorio debido a que al respecto no fue posible contar con información actualizada y suficiente relacionada al manejo de los residuos de palma africana en el país siendo un problema poco estudiado, por lo cual la misma se construyó bajo una perspectiva innovadora en la que se planteó el uso de microorganismos degradadores como una fuente de ayuda en la identificación de nuevos conceptos promisorios así como de nuevos hallazgos logrando un interés en la continuación de otros estudios relacionados al tema.

### **4.3. Diseño metodológico**

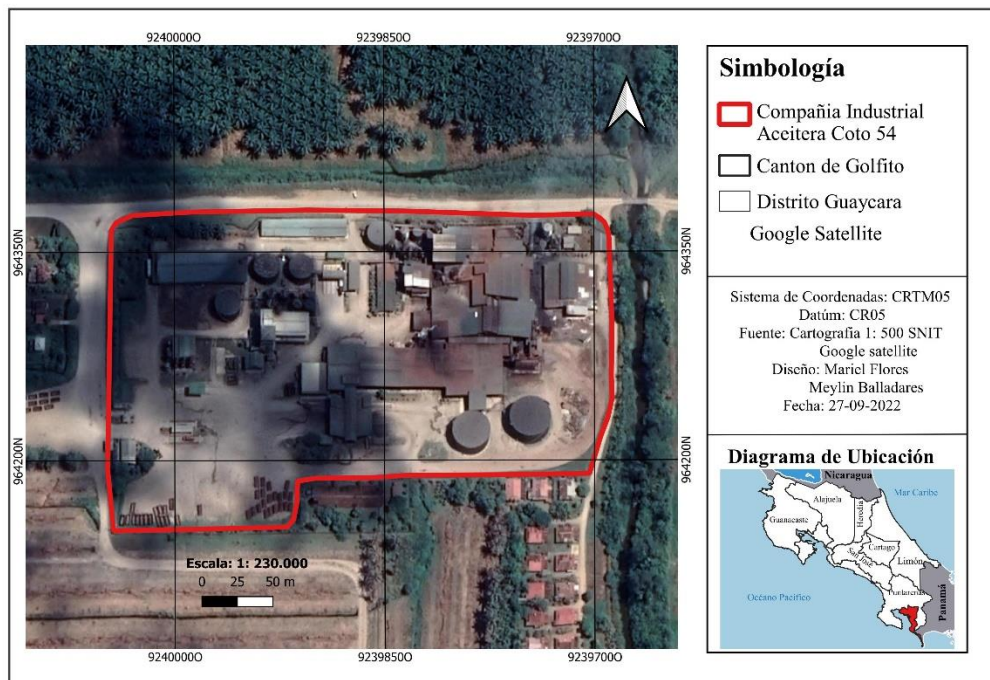
La investigación se llevó a cabo bajo un diseño metodológico de tipo experimental correspondiendo al enfoque cuantitativo debido a que se realizó la manipulación intencional de variables para el análisis de los resultados obtenido; y con respecto al enfoque cualitativo este se desarrolló bajo un diseño investigación-acción donde lo que se buscó en la investigación fue la solución de la problemática identificada en campo (Hernández, Fernández y Baptista, 2014).

### **4.4. Sitio de estudio**

El estudio se realizó en conjunto con el Laboratorio de Hidrogeología y Manejo de Recursos Hídricos de la Universidad Nacional, la Compañía Industrial Aceitera de Coto 54 y Compañía Palma Tica S.A División Coto en sus sedes ubicadas en Puntarenas, Golfito, Guaycara, Finca Coto 54 (ver Figura 4). El clima de la zona en general es tropical húmedo, los meses comprendidos entre abril y noviembre son los que presentan mayor humedad en el sector mientras que la época más seca se extiende entre diciembre y marzo. Dentro de los principales parámetros a tomar en cuenta

para la descomposición orgánica se encuentran: precipitación, humedad y temperatura. Los cuales en la zona de Golfito se promedian de la siguiente manera: precipitación por encima de los 5000 mm anuales, temperatura entre los 24 y 30 grados Celsius y la humedad entre los 75% al 95% (Ministerio de Vivienda y Asentamientos Humanos, 2013).

**Figura 4.** Mapa de ubicación Compañía Industrial Aceitera Coto 54, Planta Coto.



## 4.5. Proceso Metodológico

La descripción de la metodología utilizada en el desarrollo del proyecto se basa en tres fases, en donde cada una correspondió al cumplimiento de cada objetivo específico.

### 4.5.1. Fase I. Medio Líquido

#### 4.5.1.1. Selección de la muestra

La muestra utilizada en el desarrollo del primer objetivo correspondió al tipo no probabilístico o muestra dirigida debido a que la selección de esta no dependió de la probabilidad sino de las características de la investigación en ese momento, así como del punto de vista y propósitos de las investigadoras. Para este método se analizaron veinticuatro muestras, de las cuales seis fueron inoculadas con *Trichoderma spp* adquirido en estado líquido por medio de una marca comercial, seis fueron inoculadas en medio líquido con el hongo *P. ostreatus* adquirido en estado sólido en el Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica mientras que las doce muestras restantes correspondieron a controles de las condiciones del medio (Ver Cuadro 2.). Por su parte, el residuo de fibra de pinzote utilizado en el montaje de ensayos fue

obtenido de los subproductos de los residuos de fibra de la Planta Industrial Aceitera de Coto 54 y dicho análisis se desarrolló por 60 días.







**Cuadro 2.** *Metodologías empleadas en la Fase I.*

<b>Ensayos</b>	<b>Descripción de metodologías</b>
G	Solo medio GYM
GT	Medio GYM + <i>Trichoderma spp</i> diluido a 8L
GP	Medio GYM + <i>Pleurotus ostreatus</i>
GRT	Medio GYM + Residuo+ <i>Trichoderma spp</i> diluido a 8L
GRP	Medio GYM + Residuo + <i>Pleurotus ostreatus</i>

#### **4.5.1.2. Recolección de la información**

En el caso de los datos cuantitativos de la fase 1, se realizó en primera instancia la recolección de manera semanal con lo que se logró tener un mayor control de los cambios generados. Los datos fueron obtenidos mediante la utilización de instrumentos de medición, hojas de cálculo y una libreta de laboratorio que permitió llevar un orden adecuado de la información recolectada. En cuanto a los cualitativos, se llevó a cabo un registro de los cambios físicos semanales que se presentaron en la investigación a partir de la observación y recopilación de instrumentos visuales como fotografías que permitieron la identificación de cambios importantes con el tiempo. Además, se desarrolló una metodología basada en la codificación de la presencia de los hongos en la fibra expresada en el Cuadro 3, de manera que al tener todos los datos recolectados se lograron analizar de-forma cuantitativa.

**Cuadro 3.** Codificación de los niveles de presencia de los hongos.

Nivel de Presencia					
<i>Trichoderma spp</i>			<i>Pleurotus ostreatus</i>		
Nivel de Presencia	Código	Representación	Nivel de Presencia	Código	Representación
Nula	0		Nula	0	
Baja	1		Baja	1	
Media	2		Media	2	

Alta	3		Alta	3	
------	---	---	------	---	---

#### 4.5.1.3. Análisis de la información




Al completar la recolección de los datos, se procedió a realizar los análisis de estos en donde para datos cualitativos se identificaron las tendencias en el ciclo reproductivo de los hongos conforme el paso del tiempo del estudio a partir de la recopilación de los instrumentos visuales y anotaciones del comportamiento físico semanal. Por su parte, los datos numéricos se realizaron por medio de análisis estadísticos, los cuales estuvieron constituidos por gráficos comparativos en donde se reflejaron los cambios y comportamiento de ambos hongos y se empleó la prueba estadística ANOVA de un factor por medio de una hoja de cálculo. A continuación, se detalla la prueba mencionada:





##### 4.5.1.3.1. ANOVA


Los modelos ANOVA son utilizados para evaluar la significancia estadística, se emplea para comparar las diferencias entre los valores medios de dos o más grupos o categorías (Damodar y Dawn, 2010), dicha técnica se basa fundamentalmente en el hecho de la variabilidad total de una población o conjunto de datos, es el resultado de las variabilidades parciales debidas a los factores a tomar en cuenta. Básicamente, es un modelo estadístico apropiado a cada experimento, con teorías ya conocidas como la independencia entre sus factores, la distribución normal no sesgada de los errores experimentales y la homogeneidad de varianzas (Badii, Castillo, Cortez y Landeros, 2007).

#### 4.5.1.4. Especificaciones del equipo a usar

**Cuadro 4.** *Equipo utilizado en el presente estudio.*

Nombre del Equipo	Modelo	Función	Calibración	Foto del Equipo
A. Potenciómetro portátil	EC500	Lectura de pH las cuales se pueden realizar en campo.	Calibración externa anual	
B. Potenciómetro de mesa	Seven Compact S220	Lectura de pH.	Calibración externa anual	
C. Termómetro	Tm-902c	Medición de temperatura.	Calibración de fabrica	

D. Espectrofotómetro	Spectronic 20D	Medir en función de la longitud de onda la absorbancia de diferentes muestras.	Calibración externa anual.	
E. Microscopio	Motic	Permite observar objetos no perceptibles a al ojo humano o con mayor exactitud.	Calibración externa anual.	
F. Balanza	Sartorius	Permite obtener las mediciones exactas de los pesos de las muestras	Calibración externa anual.	
G. Digestor de kjeldahl	115V	Determinar el contenido de Nitrógeno en diferentes muestras.	Calibración anual	

H. Medidor de Humedad	Sam-Pro	Determina r la humedad y temperatur a en diferentes materiales.	Calibración de fabrica	
-----------------------------	---------	--	---------------------------	---

#### 4.5.1.5. Metodología empleada en Fase 1

El procedimiento seguido para el medio líquido se basó en la metodología utilizada por Fajardo (2016) y Rojas (2015), que consiste en la preparación del medio GYM (Agar Glucosa Extracto de Malta) para el cual se agregó en 500 ml de agua destilada:

- 5g de glucosa.
- 1g de extracto de levadura.
- 1g de fosfato de potasio.
- 0,25 g de sulfato de magnesio.
- 0,05 g de bactopectona.
- 0,5 mL de una solución mineral que contenía en un litro:
  - ✓ 0,5 mg sulfato de cobre.
  - ✓ 0,16 mg sulfato de manganeso.
  - ✓ 0,14 mg de sulfato de zinc.
  - ✓ 0,29 mg de cloruro de cobalto.

Posteriormente, se llevó a cabo el montaje de cada ensayo en erlenmeyer de 250 mL donde se agregaron según el microorganismo las siguientes las siguientes concentraciones:

- *Pleurotus ostreatus*
  - ✓ 10 g de material o residuo
  - ✓ 0.5 g de semilla del hongo
  - ✓ 100 mL del medio GYM.
- *Trichoderma*,
  - ✓ 5 g de material o residuo.
  - ✓ 4 mL de hongo.
  - ✓ 96 mL del medio GYM.

Por cada una de dichas muestras se realizaron 6 réplicas. En cuanto a los controles se realizaron cuatro con tres réplicas cada uno y distribuidos en:

- Medio GYM.
- Medio GYM + Residuo.
- Medio GYM + *Trichoderma spp.*
- Medio GYM + *Pleurotus ostreatus*.

Además, para el desarrollo de esta fase fue necesario la realización de análisis químicos entre ellos:

#### **4.5.1.5.1. Análisis de pH y temperatura**

Para las mediciones que corresponden a pH y temperatura se utilizaron los equipos B y C respectivamente descritos en el Cuadro 3, dichas mediciones se realizaron de manera directa sobre las muestras.

#### **4.5.1.5.2. Reducción de azúcares por medio de Glucosa**

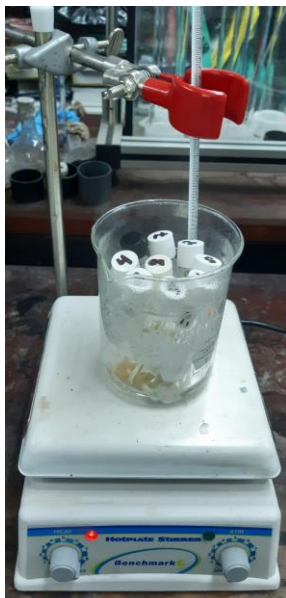
Para la realización de este análisis se tomó la metodología utilizada por Nelson y Somogyi en Castellanos y González (2003). Para este caso, inicialmente se prepararon las soluciones:

- Somogyi I
  - ✓ 12g de tartrato de sodio y potasio.
  - ✓ 24g de carbonato de sodio deshidratado.
  - ✓ 144g de sulfato de sodio.
  - ✓ 800ml de agua destilada.
- Somogyi II
  - ✓ 4g de sulfato de cobre pentahidratado.
  - ✓ 36 g de sulfato de sodio.
  - ✓ 200 ml de agua destilada.
- Reactivo de nelson
  - ✓ 25 g de molibdato de amonio.
  - ✓ 450 ml de agua destilada (se tituló hasta 500ml).
  - ✓ Incubar a 37°C por 24 a 48 horas.

Al tener los 3 reactivos listos se procedió a mezcla 8ml de Somogyi I y 2ml de Somogyi II para colocar 0,5ml de esta junto con 0,5ml de la muestra, seguidamente se sometieron las muestras a baño María con agua hirviendo por 40 minutos (Figura 4), al dejar enfriar se añadió 0,5ml de reactivo nelson y se agitó suavemente, agregando agua hasta titular a 5 ml en el tubo de ensayo. Al tener las muestras listas se procedió a realizar su respectiva lectura de la absorbancia en celda de 1 cm de ancho con una longitud de onda de 610 nm y utilizando agua destilada como

blanco, Además fue necesario estabilizar el espectrofotómetro de marca Milton Roy (Ver apartado 4.4.1.4 cuadro 3, punto D) por 20 minutos antes de iniciar con las muestras.

**Figura 5.** Baño María utilizado para los análisis del presente estudio.



#### 4.5.1.5.3. Lignina

El procedimiento utilizado se basó en la metodología desarrollada por Rojas (2015) y se aplicó al inicio y al final del ensayo. Primeramente, se pesó 1 g de muestra en un beaker; se añadió 40 mL de ácido sulfúrico al 72%, a temperatura entre los 10°C y 15°C. Una vez dispersada la muestra, se cubrió el vaso con un vidrio reloj, y se guardó en un baño a 2°C durante 2 horas. Pasadas las dos horas, se tomó un matraz de 2 L y se agregó agua destilada, trasvasando el material con agua caliente hasta llevar a una concentración del 3%. Se procedió a hervir la solución durante 4 horas, después se dejó precipitar el material insoluble, se decantó la solución sobrenadante a través de una filtración crisol y se transfirió la lignina cuantitativamente al filtro. Finalmente, se lavó la lignina, con abundante agua caliente hasta dejarla libre de ácido y se secó el crisol con la lignina en un horno a 105±3 °C, hasta alcanzar peso constante, se pesó y se procedió a realizar los cálculos:

Ecuación 1. Lignina

$$\% \text{ Lignina} = ((A * 100) / W)$$

Donde:

A: Lignina en gramos.

W: Gramos de muestra libre de humedad

## 4.5.2. Fase II: Medio Sólido

### 4.5.2.1. Selección de la muestra

Para el desarrollo del medio sólido la muestra se determinó bajo el tipo no probabilística, mediante la metodología expuesta en Balladares y Flores (2018), en donde se utilizaron cuatro contenedores de vidrio con dimensiones 50x25x30 cm, a las cuales se les aplicó tierra en una relación 1:3 al tamaño del alto de la pecera, agregando el hongo en semilla.

### 4.5.2.2. Recolección de la información

La recolección de la información durante el desarrollo de esta fase se llevó a cabo igual a la descrita en el Apartado 4.4.1.2.

### 4.5.2.3. Análisis de la información

El análisis de la información realizado durante esta fase fue igual al empleado en el apartado 4.4.1.3.

### 4.5.2.4. Metodología Fase II

El proceso de montaje de las muestras consiste en colocar sobre una base de Tierra una parte de fibra en montículos y otra enterrada en conjunto con el hongo *Trichoderma spp* aplicado en forma líquida bajo las metodologías expuestas en el Cuadro 5.

**Cuadro 5.** Metodología empleada en medio sólido

Código de ensayo en Contenedor	Metodología
S	Suelo
BE	Suelo +Residuo enterrado
BM	Suelo +Residuo en montículo
8ME	Suelo +Residuo+ Hongo <i>Trichoderma spp</i> diluido a 8L
8MM	Suelo +Residuo+ Hongo <i>Trichoderma spp</i> diluido a 8L

Para la validación de esta fase se realizarán los siguientes análisis químicos:

#### 4.5.2.4.1. Relación C/N

Se estableció la relación C/N bajo los resultados obtenidos en las siguientes metodologías.

##### a. Análisis Carbono

Se pesaron 0.25 g de suelo de las muestras en balones de 100 mL, se agregaron con pipeta 10 mL de dicromato de potasio 1N para el cual previamente, fue necesario desecar 49,04 g durante 1 hora a 105°C y una vez desecado se disolvió en agua destilada hasta alcanzar volumen de 1L. A partir de que se adicionó la solución, se agregó 10 mL de ácido sulfúrico concentrado a cada muestra, se dejaron enfriar y se procedió con el aforo de cada una. Seguidamente, se tomaron alícuotas de 10 mL de las muestras en erlenmeyer y en otro 2 mL de dicromato de potasio 1N, a estos se les agregó cinco gotas de ácido fosfórico concentrado y dos gotas del indicador elaborado mediante la disolución de 0,5g de difenilamina en una mezcla de 100 ml de ácido sulfúrico concentrado y 20 ml de agua.

Posteriormente, fueron tituladas las muestras con sal de Mohr para la cual fue necesario mezclar 78,4g de  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en 500 mL de agua destilada que contenía 30 ml de ácido sulfúrico hasta alcanzar un volumen de 2L. Conforme se añadió la sal de Mohr a cada muestra, la solución cambió de un color violeta a un verde esmeralda. Por último, en cada prueba se procedió a anotar los mL gastados de sal de Mohr y a calcular el porcentaje de carbono de acuerdo con las siguientes fórmulas (Jackson,1964):

##### Ecuación 2. Normalidad sal de Mohr

$$N \text{ sal Mohr: } 2 / \text{Volumen consumido}$$

##### Ecuación 3. Cálculo de % de materia orgánica

$$\% \text{ MO: } ((C_n * V) \text{ Cr}_2\text{O}_7 - (V * N * 10) \text{ sal Mohr} / \text{Masa muestra}) * 0,67$$

##### Ecuación 4. Cálculo de % de Carbono

$$\% \text{ C.O: } \% \text{ MO} / 1,724$$

Donde:

C<sub>n</sub>\*V: Concentración por volumen de dicromato de potasio.

V: Volumen consumido de la muestra.

N: Normalidad de la muestra.

### **b. Análisis Nitrógeno**

Primeramente, se pesó cerca de 0,1 g de muestra de suelo en cada ensayo y se colocaron en balones de Kjendhal de 100 mL, seguido de esto se preparó mezcla digestiva para lo cual fue necesario pesar 80,0 g de sulfato de potasio en 1 L de ácido sulfúrico concentrado, agregar 10mL de selenito de sodio (Anexo 1) y 10 mL de sulfato de cobre (Anexo 2), se añadió 3,5 mL de mezcla digestiva preparada a cada balón y se procedió a colocar las muestras en el digestor Kjendhal (Ver punto 4.4.1.4 cuadro 4, apartado F), hasta que alcanzaron un color transparente. Posteriormente, se dejaron enfriar y se agregó agua destilada, alcalinizando con hidróxido de sodio 1+1, para dicho reactivo se pesó 1 kg de hidróxido de sodio y 0,2 g de fenolftaleína, y se adicionó 1 L de agua destilada Las muestras fueron destiladas por arrastre de vapor durante 4 minutos a partir de que la solución receptora del nitrógeno se tornó verde. Después, se tomaron los destilados en 10 mL de la solución de ácido bórico (Anexo 3) con indicador Shiro Tashiro (Anexo 4), y se titularon con ácido sulfúrico 0,02 N (Anexo 5), hasta obtener un color azul grisáceo. Finalmente, se calcularon los porcentajes de nitrógeno de acuerdo con la siguiente fórmula (Jackson,1964):

#### Ecuación 5. Cálculo de % Nitrógeno

$$\% N: V * N * 0,014 * 100 / m$$

Dónde:

V: volumen en mL ácido sulfúrico.

N: Normalidad del ácido.

m: masa de muestra.

#### **4.5.2.5. Análisis de pH, humedad y temperatura**

Para las mediciones de temperatura, humedad y pH se utilizó el equipo de medición mencionados en el Cuadro 4 apartados A, G y C respectivamente. En este estudio, las mediciones de los dos primeros parámetros temperatura y humedad se realizaron de manera directa con los equipos de laboratorio.

Los análisis de pH en esta fase se realizaron utilizando la metodología establecida en Arce et. Al. (2006) en donde, primeramente, se pesó 1 g de suelo y se colocó en un vaso de precipitado de 25 ml. Seguidamente se agregó 10 ml de agua destilada, se agitó y dejó reposar por 10 minutos y se ajustó el potenciómetro con las soluciones amortiguadoras, pasado el tiempo de reposo se procedió a medir el pH con el potenciómetro.

### 4.5.3. Fase III: Campo

#### 4.5.3.1. Selección de la muestra

En la tercera fase la selección de la muestra correspondió a no probabilística, esta fase se llevó a cabo con el microorganismo seleccionado según la efectividad de degradación, el cual correspondió a *Pleurotus ostreatus*, mientras que el montaje del ensayo se realizó en el departamento de investigación la empresa Palma Tica S.A. en donde se destinó un área para evaluar el funcionamiento del hongo bajo las condiciones y variables del lugar.

#### 4.5.3.2. Recolección de la información

La recolección de la muestra en la Fase III se realizó en periodos de quince días para la valoración de pH, temperatura y humedad en donde se utilizó el equipo descrito en el Apartado 4.4.1.4, Cuadro 4, puntos A, C y G, mientras que los análisis cualitativos se llevaron a cabo semanalmente.

#### 4.5.3.3. Metodología por emplear en campo

Para el desarrollo de la fase III se valoró en campo el funcionamiento del hongo seleccionado, en este caso expuesto a las variantes de temperatura, humedad y pH propios del lugar destinado para el estudio, así como otros organismos presentes. En búsqueda de una mejor alternativa de aplicación del hongo se planteó la escogencia de una metodología que colabore con el funcionamiento del microorganismo según los resultados obtenidos en la fase 1 y fase 2 así como recomendaciones en campo por parte del equipo de investigación de la empresa.

##### 4.5.3.3.1. Aplicación de fibra con hongo *Pleurotus*.

Se planteó la utilización en campo del residuo de fibra con un área de 50 cm<sup>2</sup> y una altura de 30 cm por ensayo, en donde se aplicaron cuatro diferentes métodos de evaluación con las variaciones expuestas en el Cuadro 6.

**Cuadro 6.** Descripción de metodología por aplicar

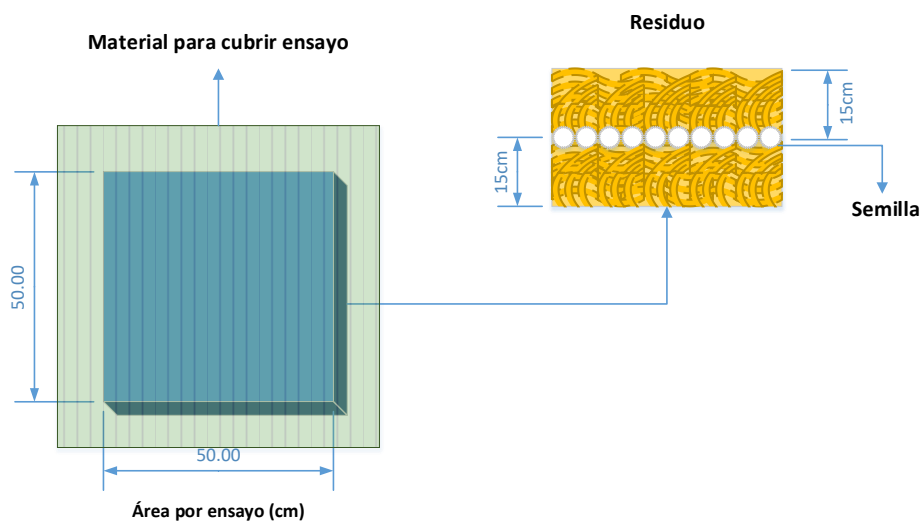
Ensayos	Replicas	Descripción de metodologías
FBS	2	Blanco de fibra sin aplicación de agua
FBH	2	Blanco de fibra con aplicación de agua*
FPS	2	Fibra + <i>Pleurotus ostreatus</i>
FPH	2	Fibra + <i>Pleurotus ostreatus</i> + aplicación de agua*

\*Aplicación de agua.

Una vez definidos los ensayos, se procedió a realizar el montaje en los terrenos de la Compañía. Para ello se calculó la cantidad de fibra a utilizar de acuerdo con las dimensiones indicadas, seguidamente se estableció una aplicación del 3% de semillas de hongo *Pleurotus ostreatus* (390 g aproximadamente) según el peso obtenido del sustrato en este caso del residuo de

fibra (13 kg) en base húmeda (Ver Figura 5). Debido a que, dentro de los resultados obtenidos, el crecimiento del hongo se beneficia mayormente de la fase oscura, se procedió a tapar los ensayos mediante una doble capa de sarán que permitió potenciar el crecimiento del microorganismo y mitigar su contaminación durante las primeras semanas. En el caso de los ensayos que indican aplicación de agua, ésta se realizó una vez a la semana con un aproximado de 1,5 L. Por otro lado, una vez que se inició el ensayo, se procedió a realizar los registros cualitativos y cuantitativos requeridos de humedad, pH, temperatura y fotografías de campo, durante el periodo de estudio.

**Figura 6.** Ilustración de aplicación en campo.



## 5. RESULTADOS

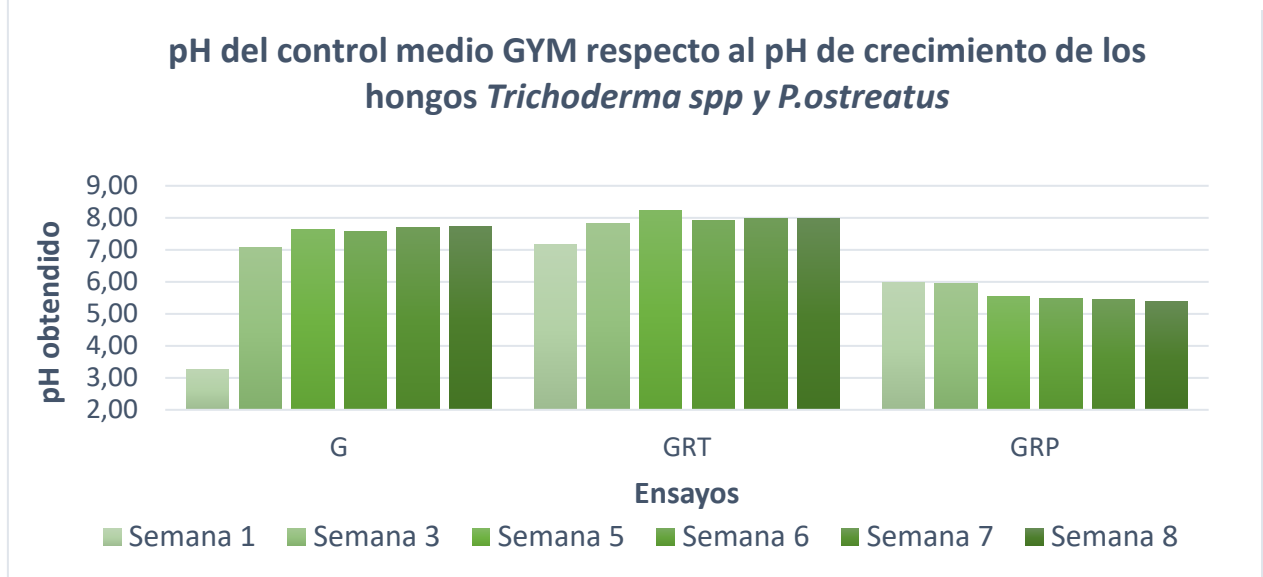
### 5.1. Fase 1. Ensayos Medio líquido

#### 5.1.1. Análisis Cuantitativos

##### 5.1.1.1. pH

**Cuadro 7.** Datos de pH promedios y desviación estándar (SD) obtenidos por ensayo.

Ensayo		G	GR	GT	GP	GRT	GRP
Semana 1	pH	3,25	4,82	3,81	5,61	7,17	5,97
	SD	0,05	0,22	0,02	0,68	0,02	0,42
Semana 3	pH	7,06	7,69	7,47	7,20	7,81	5,96
	SD	0,05	0,17	0,11	0,10	0,00	0,78
Semana 5	pH	7,64	7,75	8,04	7,50	8,22	5,54
	SD	0,13	0,1600	0,13	0,26	0,08	0,34
Semana 6	pH	7,56	7,85	8,05	7,41	7,92	5,48
	SD	0,24	0,09	0,06	0,25	0,08	0,19
Semana 7	pH	7,70	7,79	8,14	7,56	7,96	5,45
	SD	0,05	0,22	0,13	0,10	0,08	0,08
Semana 8	pH	7,73	7,92	8,13	7,56	7,98	5,38
	SD	0,06	0,21	0,14	0,18	0,23	0,23

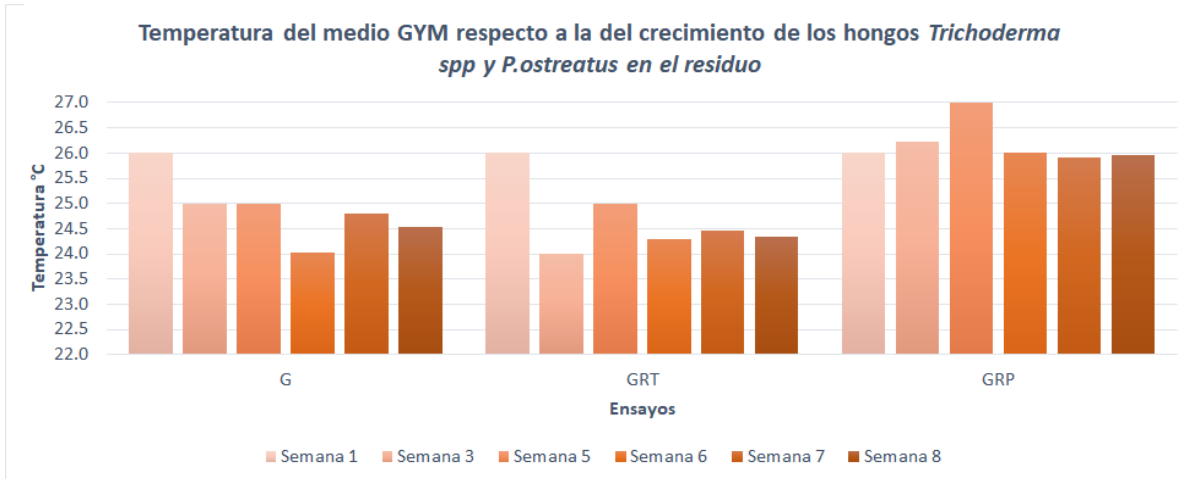
**Figura 7.** Resultados obtenidos de pH del medio GYM con respecto a GRT y GRP.

### 5.1.1.2. Temperatura

**Cuadro 8.** Datos de temperatura y desviación estándar (SD) obtenidos semanalmente.

Ensayo		G	GR	GT	GP	GRT	GRP
Semana 1	Temperatura	26,00	26,00	26,00	26,00	26,00	26,00
	SD	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Semana 3	Temperatura	25,00	24,50	23,00	26,00	24,00	26,22
	SD	0,00	1,00	00,00	0,00	0,00	0,44
Semana 5	Temperatura	25,00	25,00	25,00	26,00	25,00	27,00
	SD	1,00	0,82	0,00	0,00	0,89	0,44
Semana 6	Temperatura	24,03	24,23	24,43	25,37	24,28	26,00
	SD	0,15	0,33	0,12	0,40	0,08	0,66
Semana 7	Temperatura	24,80	24,80	24,47	25,47	24,45	25,91
	SD	0,10	0,10	0,15	0,59	0,27	0,53
Semana 8	Temperatura	24,53	24,53	24,80	25,6	24,35	25,96
	SD	0,23	0,37	0,20	0,20	0,34	0,27

**Figura 8.** Datos de temperatura obtenidos en medio GYM respecto a GRT Y GRP.

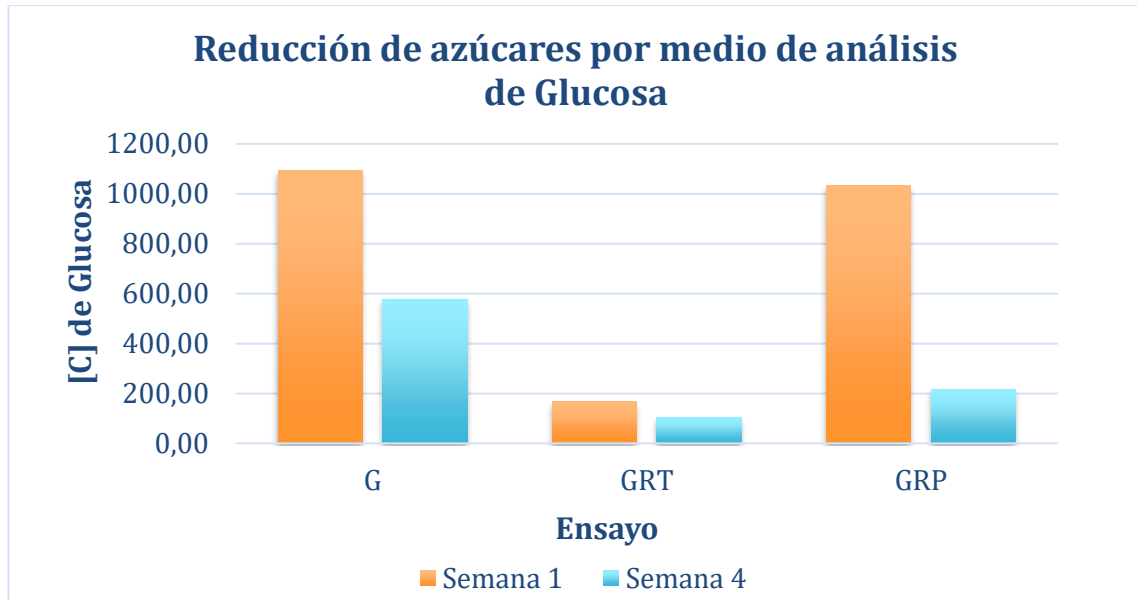


### 5.1.1.3. Actividad enzimática por Glucosa

**Cuadro 9.** Datos obtenidos de glucosa según análisis inicial e intermedio

Muestra	Semana 1	Semana 4
G	1092,03	577,82
GR	233,52	40,36
GT	325,05	24,77
GP	687,22	133,90
GRT	166,88	103,33
GRP	1031,61	217,58

**Figura 9.** Gráfico obtenido de reducción de azúcares en medio GYM respecto GRT y GRP.



#### 5.1.1.4. Análisis de lignina

**Cuadro 10.** Resultados de los análisis de lignina en la Fase II.

Muestra	% Lignina
Fibra sin tratar *	6,21
GRP	7,91
GRT	1,97

\*Fuente: Van, 2016

#### 5.1.1.5. Análisis de Varianza Anova para los Datos Cualitativos

**Cuadro 11.** Resultados de Análisis Varianza.

Hipótesis nula	p obtenido	Decisión
Las medias de pH son las mismas para cada ensayo en la semana 1	6,1861E-05	Rechaza hipótesis nula
Las medias de pH son las mismas para todos los ensayos en la semana 8	3,8784E-08	Rechaza hipótesis nula

Las medias de Temperatura son las mismas para todos los ensayos en la semana 8

1,2759E-07

Rechaza hipótesis nula

## 5.1.2. Análisis cualitativos

### 5.1.2.1. Codificación del desarrollo de los hongos.

**Cuadro 12.** *Análisis del comportamiento de los controles del ensayo según semanas.*

Ensayo	Nivel de presencia		
	Semana 0	Semana 4	Semana 8
G1	0	0	0
G2	0	0	0
G3	0	0	1
GR1	0	0	0
GR2	0	0	0
GR3	0	0	0
8GT.1	0	0	0
8GT.2	0	0	0
8GT.3	0	0	1
GP1	0	0	0
GP2	0	0	0
GP3	0	0	1

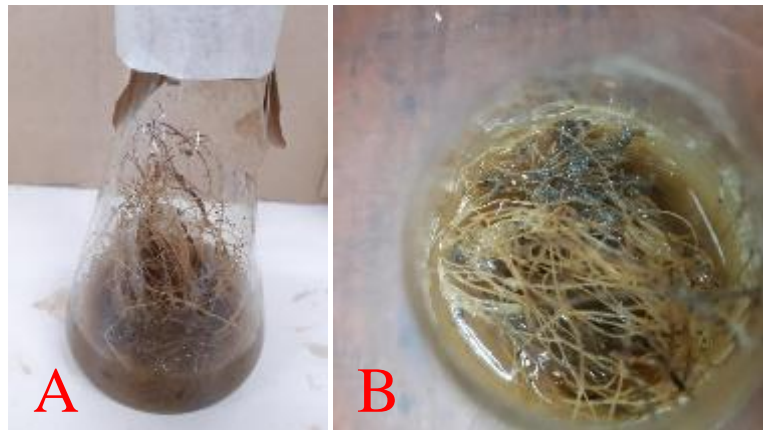
**Cuadro 13.** *Análisis del desarrollo de los hongos con el residuo según semanas.*

Ensayo	Nivel de presencia		
	Semana 0	Semana 4	Semana 8
8GRT.1	0	1	0
8GRT.2	0	1	1

8GRT.3	0	2	2
8GRT.4	0	1	1
8GRT.5	0	1	1
8GRT.6	0	1	0
GRP1	0	3	3
GRP2	0	1	0
GRP3	0	3	3
GRP4	0	3	3
GRP5	0	3	3
GRP6	0	3	3

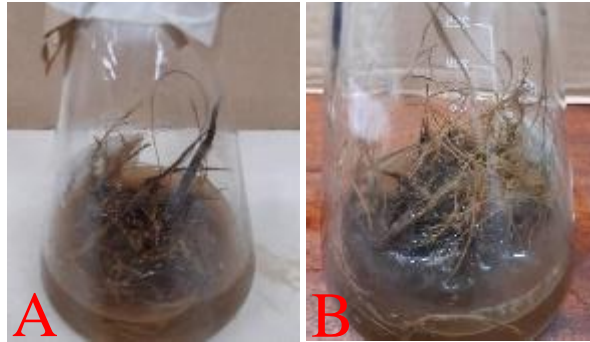
**5.1.2.2. Fotografías de los ensayos en medio GYM en conjunto con residuo.**

**Figura 10.** *Ensayo GYM con residuo. A: Semana 2; B: Semana 8.*

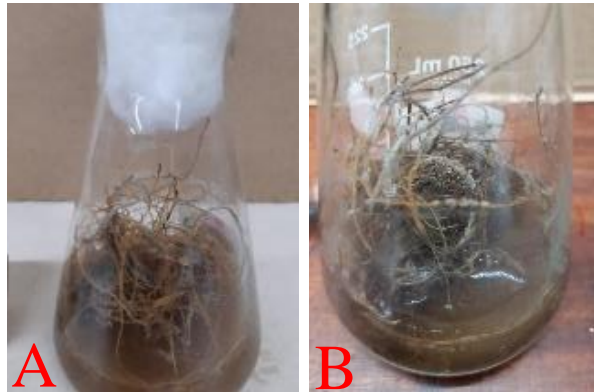


### 5.1.2.3. Fotografías del ensayo inoculado con *Trichoderma spp*

**Figura 11.** Ensayo GRT con menor presencia del hongo. A: Semana 2; B: Semana 8.

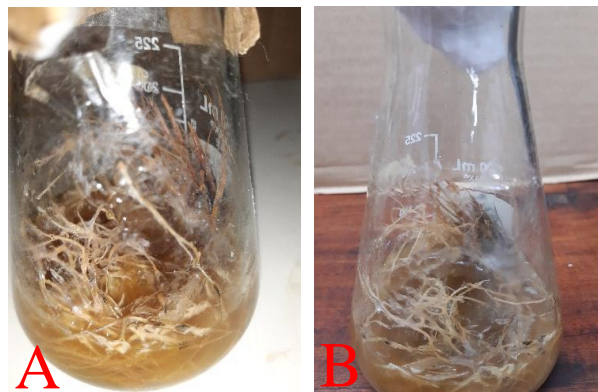


**Figura 12.** Ensayo GRT con mayor presencia del hongo. A: Semana 2; B: Semana 8.

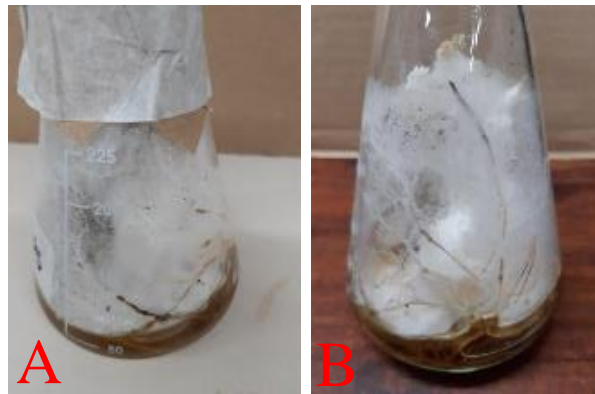


### 5.1.2.4. Fotografías del ensayo inoculado con *Pleurotus ostreatus*

**Figura 13.** Ensayo GRP con menor presencia del hongo. A:Semana 2; B:Semana 8.



**Figura 14.** *Ensayo GRP con mayor presencia del hongo. A: Semana 2; B: Semana 8.*



## 5.2. Fase 2. Ensayos Medio sólido

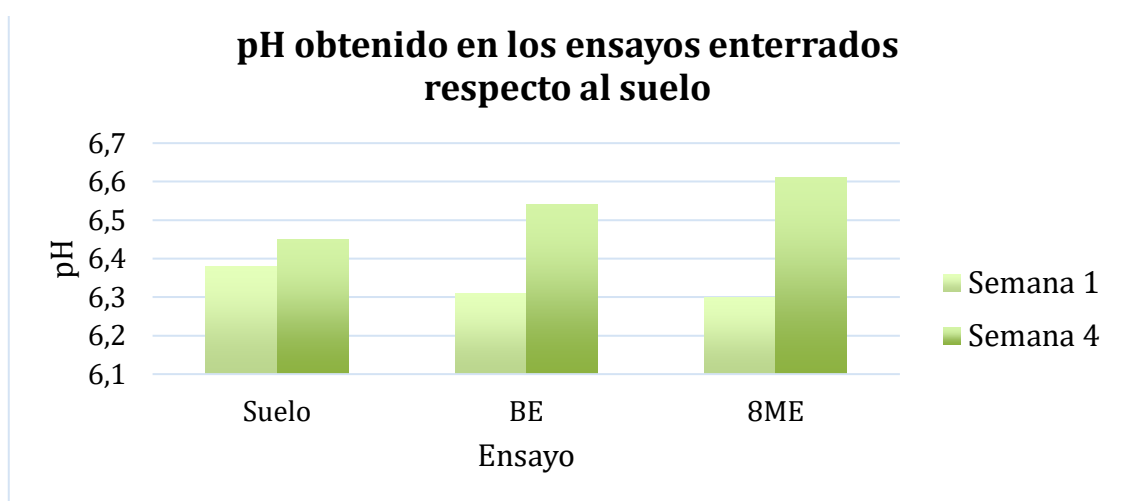
### 5.2.1. Análisis Cuantitativos

#### 5.2.1.1. pH

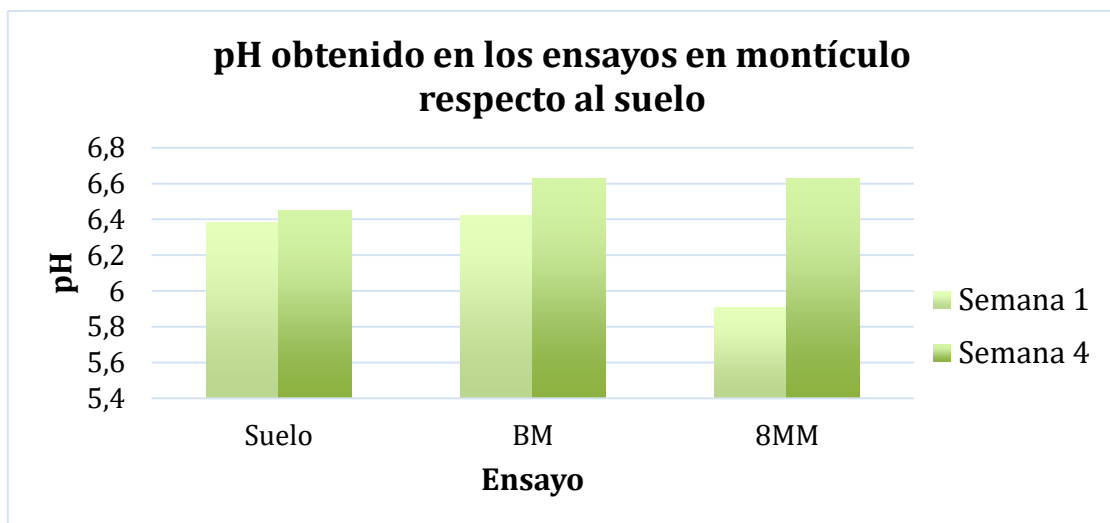
**Cuadro 14.** *Resultados de pH obtenidos en la fase II.*

Muestras	pH	
	Semana 1	Semana 4
Tierra	6,38	6,45
BE	6,31	6,54
BM	6,42	6,63
8ME	6,30	6,61
8MM	5,91	6,63

**Figura 16.** Resultados de pH obtenidos en la metodología enterrada, Fase II.



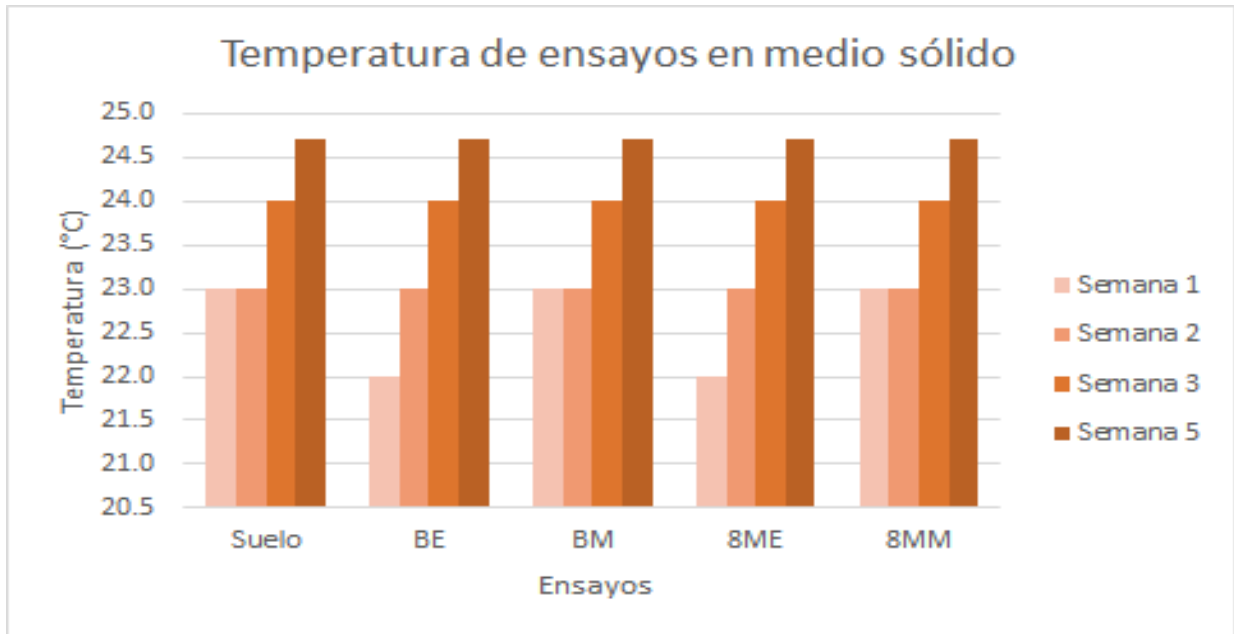
**Figura 15.** Resultados de pH obtenidos en la metodología en montículo, Fase II.



#### 5.2.1.2. Temperatura

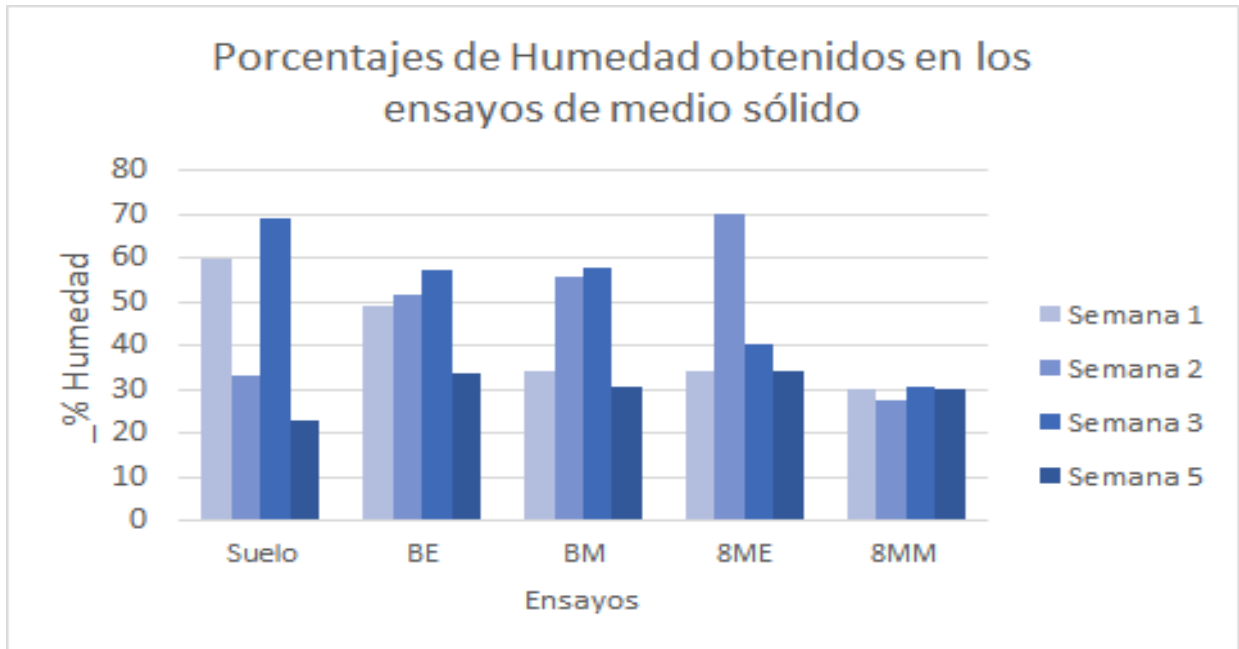
**Cuadro 15.** Resultados obtenidos de las mediciones de temperatura semanalmente.

Ensayos	Temperatura (°C)			
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 5
Suelo	23	23	24	25
BE	22	23	24	25
BM	23	23	24	25
8ME	22	23	24	25
8MM	23	23	24	25

**Figura 17.** Datos de temperatura obtenidos según las mediciones semanales.**5.2.1.3. Humedad****Cuadro 16.** Resultados de humedad obtenidos semanalmente.

Ensayos	Humedad (%)			
	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 5
Suelo	60,0	33,1	68,8	23,0
BE	49,1	51,8	57,0	33,5
BM	34,4	55,9	57,9	30,4
8ME	34,4	70,0	40,2	31,0
8MM	30,0	27,3	30,5	30,0

**Figura 18.** Datos obtenidos de Humedad semanalmente previo a la adición de agua.

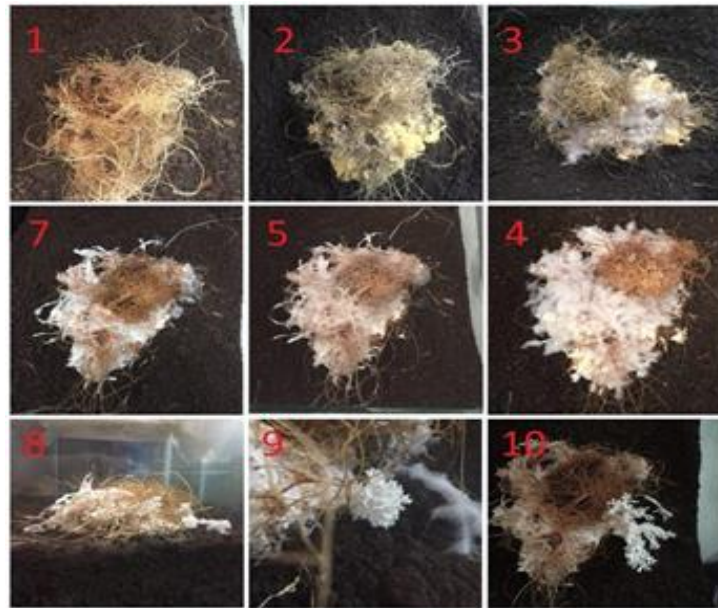


#### 5.2.1.4. Relación C/N

**Figura 19.** Comparación de muestras con escasa luz (M1-E) y blanco (BE) ambas enterradas.



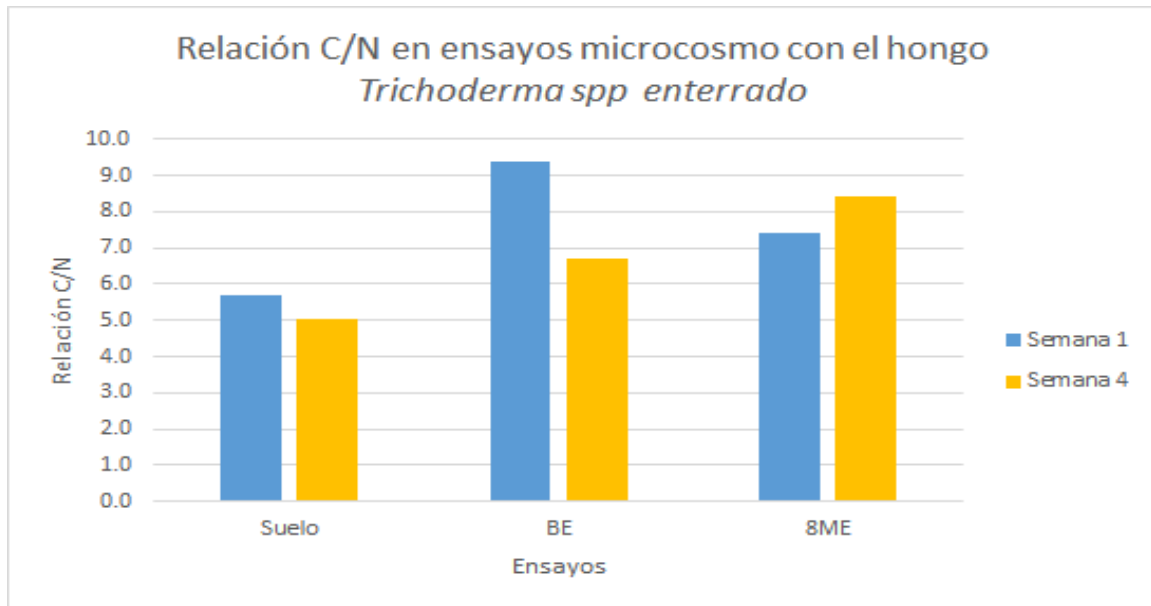
**Figura 20.** Fotografías de *P. ostreatus* en montículo con ambiente cerrado, semanales.



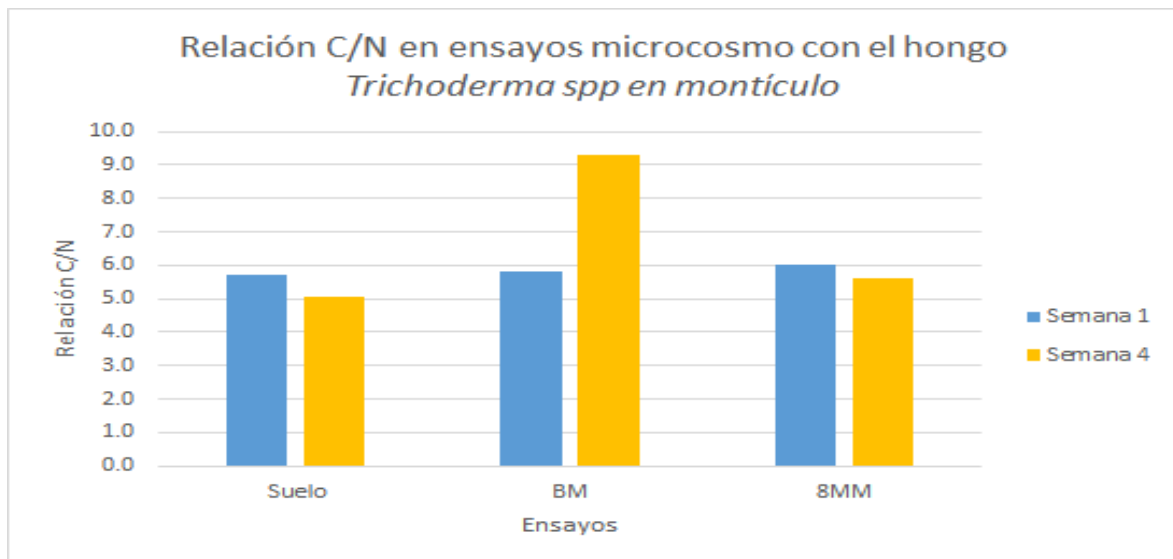
**Cuadro 17.** Datos obtenidos de relación Carbono/Nitrógeno en cada ensayo.

Muestra	Relación C/N	
	Semana 1	Semana 4
Suelo	5,71	5,06
BE	9,38	6,69
BM	5,82	9,28
8ME	7,43	8,43
8MM	6,02	5,63

**Figura 21.** Gráfico comparativo relación C/N en ensayos con la fibra enterrada y suelo con *Trichoderma*.



**Figura 22.** Gráfico comparativo relación C/N en ensayos con la fibra en montículos y suelo con *Trichoderma*.



## 5.2.2. Análisis Cualitativos

### 5.2.2.1. Fotografías de los ensayos en microcosmos

**Figura 23.** Ensayo en medio sólido inoculado con *Trichoderma* spp. A: Semana 2; B: Semana 8



**Figura 24.** Ensayo en medio sólido fibra sin microorganismo. A: Semana 2; B: Semana 8.



### 5.3. Fase 3. Ensayos

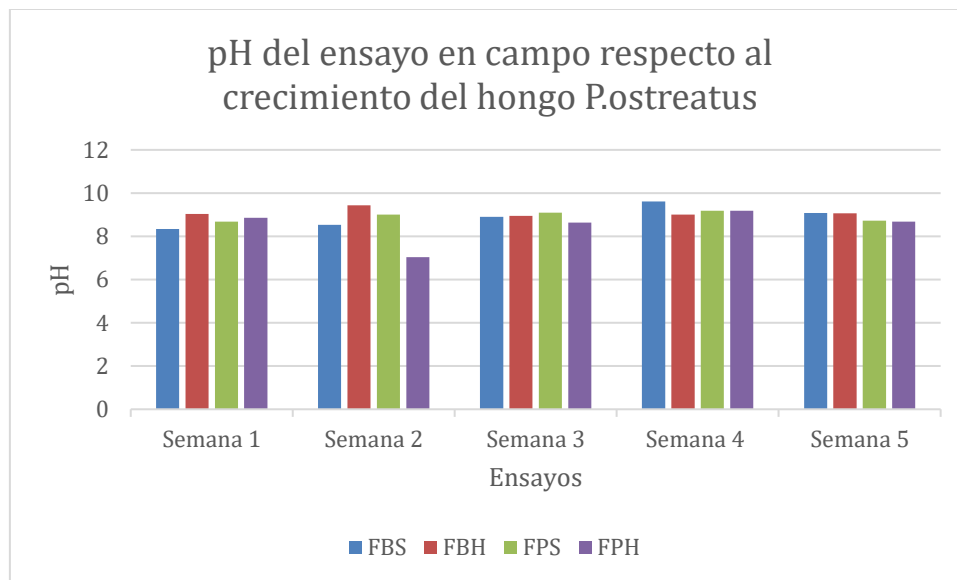
#### 5.3.1. Análisis Cuantitativos

##### 5.3.1.1. pH

**Cuadro 18.** Resultado de pH obtenidos en la fase III

Ensayo		FBS	FBH	FPS	FPH
Semana 1	pH	8,34	9,04	8,68	8,86
	SD	1,32	0,54	1,01	0,42
Semana 2	pH	8,53	9,43	9,01	7,04
	SD	0,46	0,19	0,08	0,63
Semana 3	pH	8,91	8,94	9,09	8,63
	SD	0,36	1,17	0,25	0,65
Semana 4	pH	9,62	9,00	9,18	9,19
	SD	0,34	0,66	0,18	0,05
Semana 5	pH	9,08	9,07	8,72	8,68
	SD	1,19	0,50	1,09	0,65

**Figura 25.** Gráfico de resultado de pH obtenidos en la fase III.



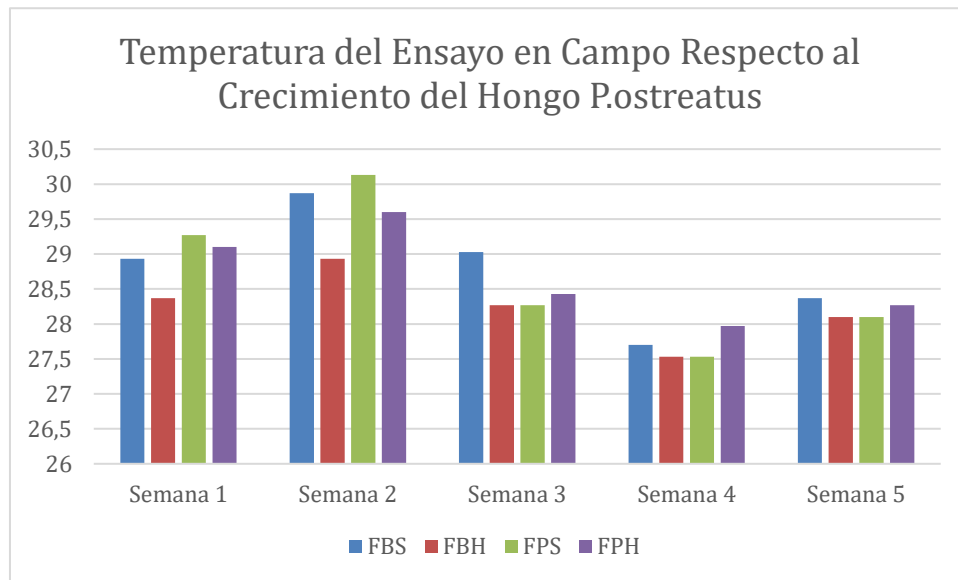
##### 5.3.1.2. Temperatura.

**Cuadro 19.** Resultados obtenidos de las mediciones de temperatura.

Ensayo		FBS	FBH	FPS	FPH
Semana 1	Temperatura	28,93	29,37	29,27	29,10
	SD	0,40	0,75	1,12	0,96
Semana 2	Temperatura	29,87	28,93	30,13	29,60
	SD	1,40	0,51	0,58	0,53
Semana 3	Temperatura	29,03	28,27	28,27	28,43

Semana 4	SD	1,27	0,87	0,46	0,51
	Temperatura	27,70	27,53	27,53	27,97
Semana 5	SD	0,79	0,68	0,25	0,76
	Temperatura	28,37	28,10	28,10	28,27
	SD	0,51	0,53	0,69	0,25

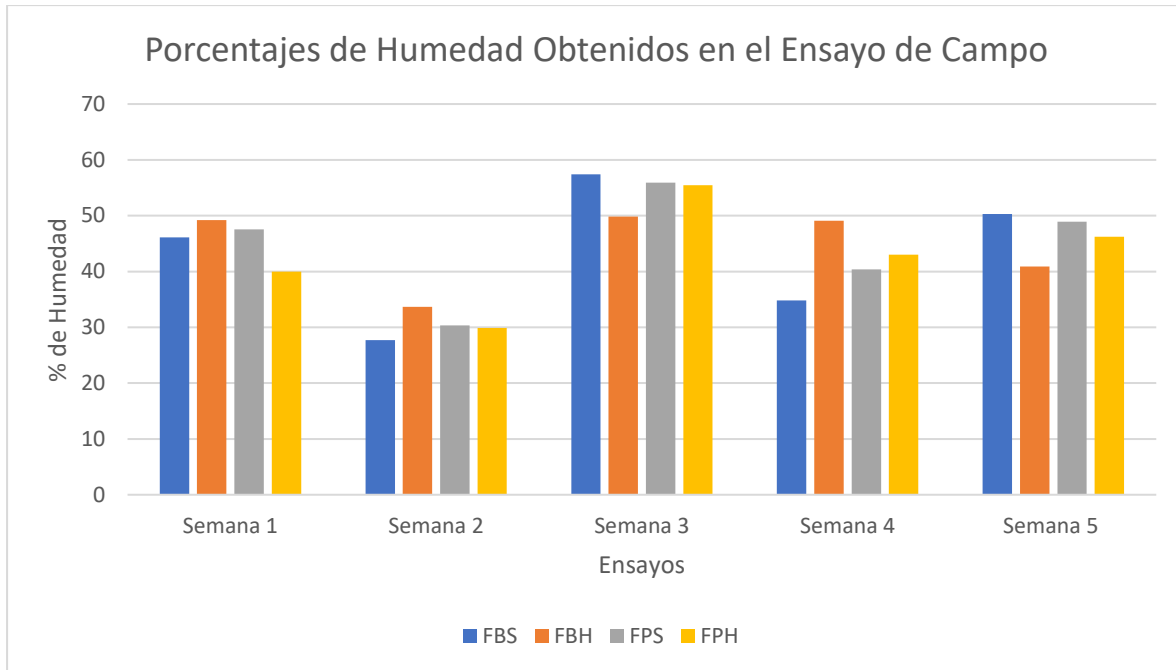
**Figura 26.** Gráfico de resultado de temperatura obtenidos en campo.



### 5.3.1.3. Humedad

**Cuadro 20.** Resultados obtenidos de las mediciones de humedad.

Ensayo		FBS	FBH	FPS	FPH
Semana 1	Humedad	46,10	49,23	39,96	47,53
	SD	13,35	14,58	13,01	3,61
Semana 2	Humedad	27,71	33,65	30,36	29,89
	SD	0,34	5,31	1,25	1,91
Semana 3	Humedad	57,43	49,84	55,91	55,91
	SD	10,85	4,40	14,95	14,03
Semana 4	Humedad	34,81	49,11	40,38	43,00
	SD	1,50	8,80	10,53	16,34
Semana 5	Humedad	50,30	40,92	48,89	47,38
	SD	15,39	7,02	9,60	7,17

**Figura 27.** Gráfico de resultados de humedad obtenidos en campo.

#### 5.3.1.4. Análisis de Varianza Anova para Datos Cuantitativos.

**Cuadro 21.** Resultados de Análisis de Varianza para la Fase III

Hipótesis nula	p obtenido	Decisión
Las medias de pH son las mismas para cada ensayo en la semana 1	0,44	Conserva hipótesis nula
Las medias de pH son las mismas para todos los ensayos en la semana 5	0,31	Conserva hipótesis nula
Las medias de Temperatura son las mismas para todos los ensayos en la semana 1	0,88	Conserva hipótesis nula
Las medias de Temperatura son las mismas para todos los ensayos en la semana 5	0,87	Conserva hipótesis nula
Las medias de humedad son las mismas para todos los ensayos en la semana 1	0,62	Conserva hipótesis nula
Las medias de humedad son las mismas para todos los ensayos en la semana 5	0,73	Conserva hipótesis nula

### 5.3.2. Análisis Cualitativos.

#### 5.3.2.1. Fotografías

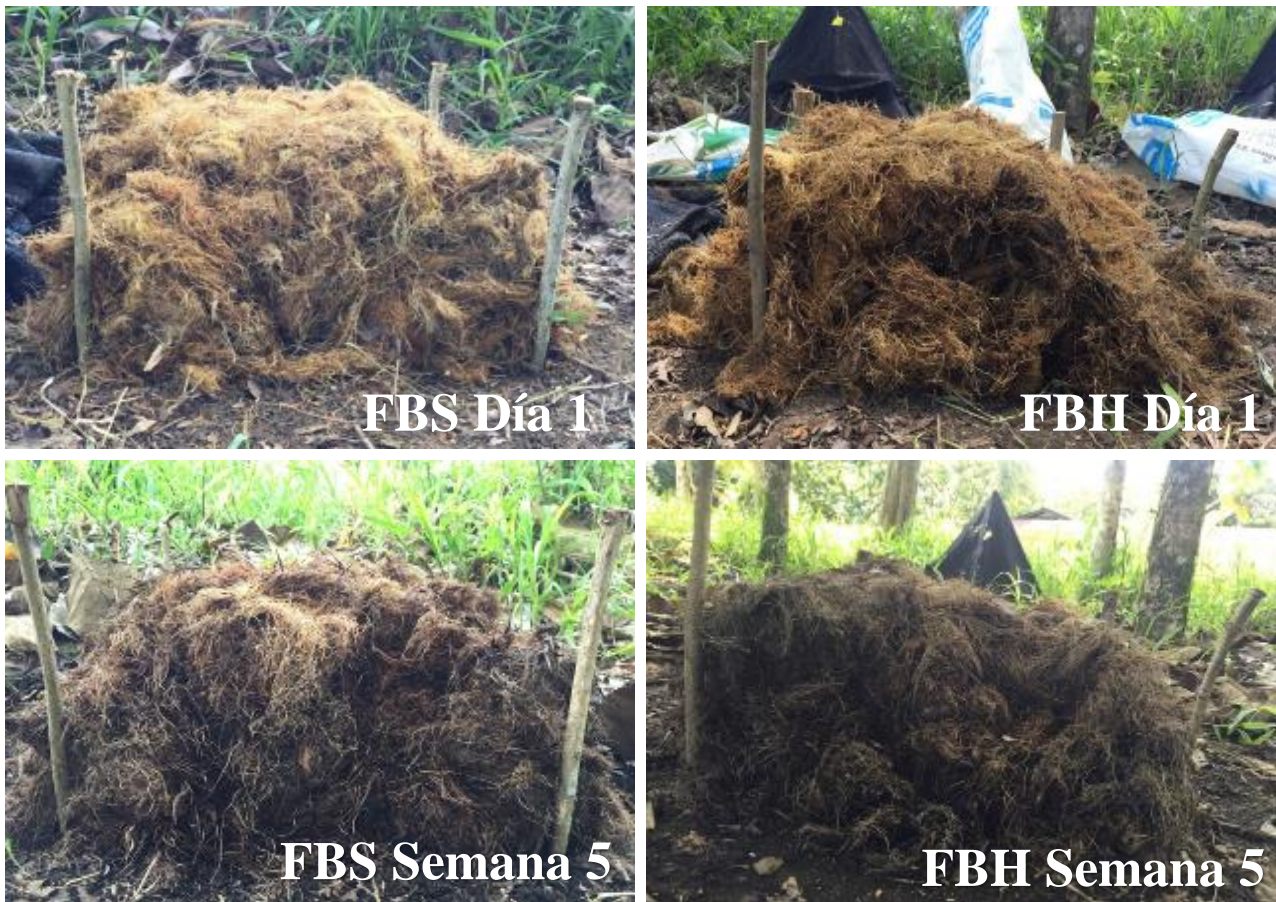
**Figura 28.** Colocación de ensayos en campo bajo metodología seleccionada en el día 1.



**Figura 29.** Presencia del hongo *N. crassa* ensayo FPS en Semana 1.



**Figura 30.** Comparación de ensayos FBH y FBS en campo.



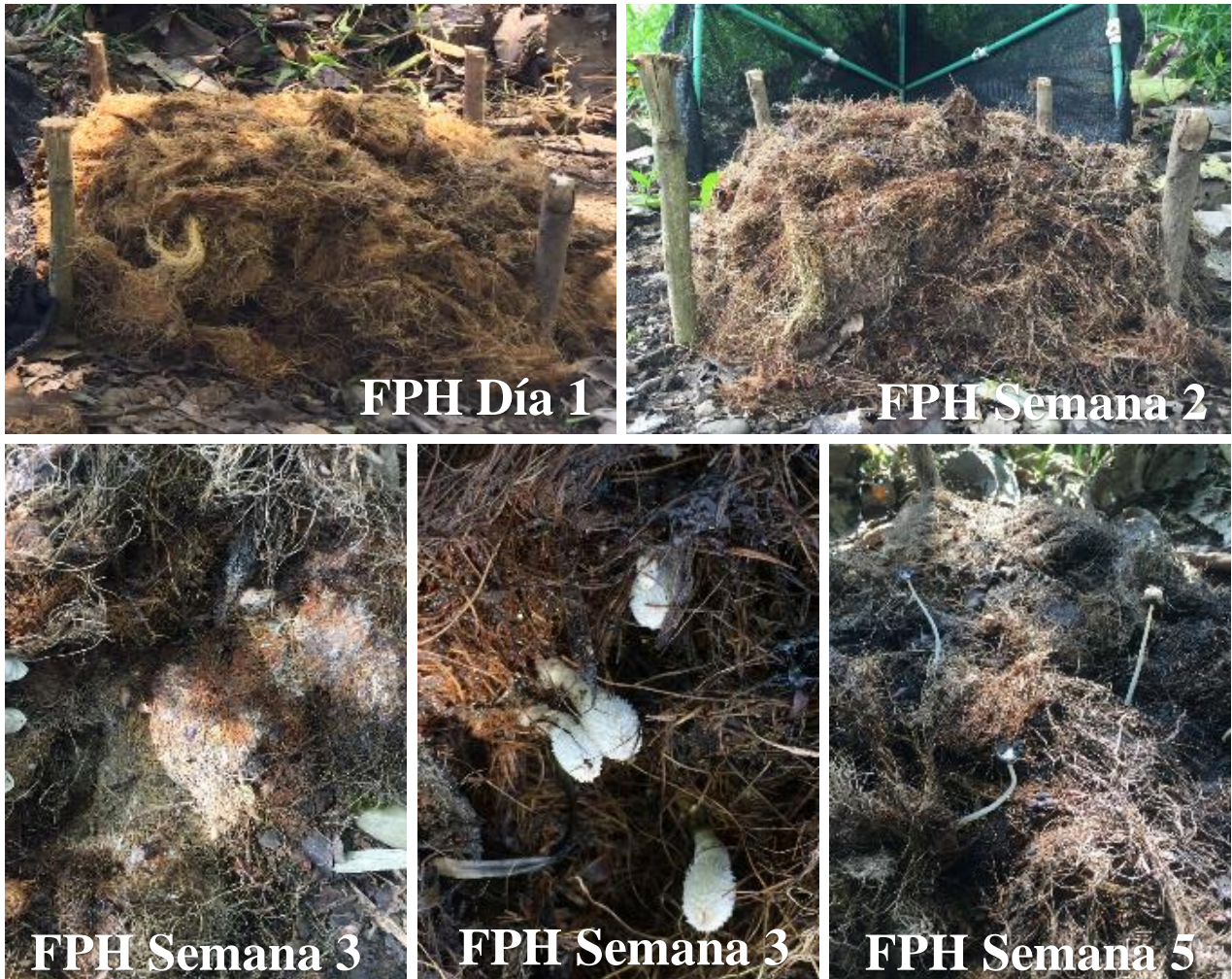
**Figura 31.** *Ensayo FPH con menor presencia de P. ostreatus en campo.*



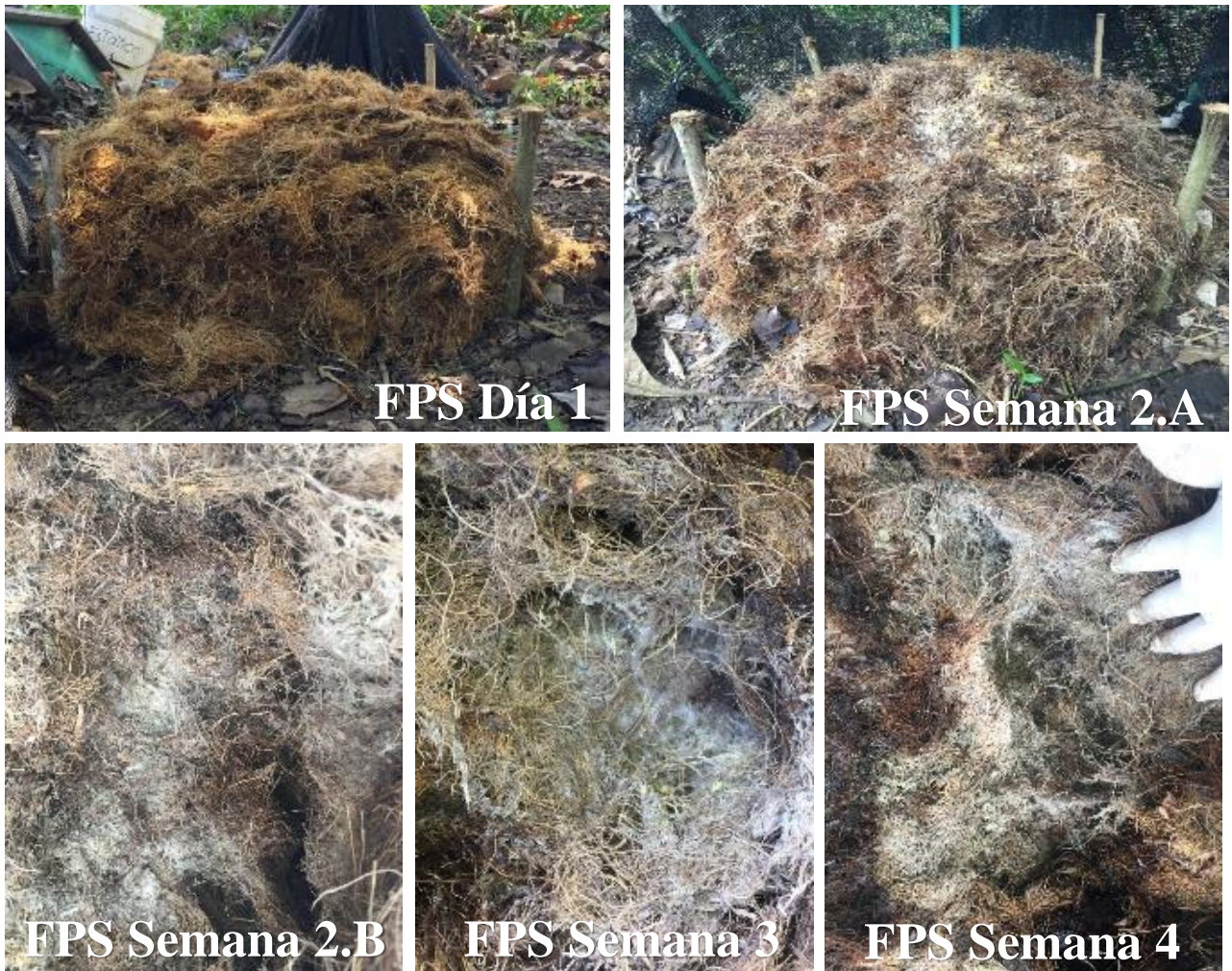
**Figura 32.** *Ensayo FPS con menor presencia de P. ostreatus en campo.*



**Figura 33.** *Ensayo FPH con mayor presencia de P. ostreatus en campo.*



**Figura 34.** *Ensayo FPS con mayor presencia de P. ostreatus en campo.*



## 6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Durante el desarrollo del proyecto se inició con la elaboración y cumplimiento de las Fase I y Fase II, las cuales funcionan como base de referencia sobre el comportamiento de los hongos *Trichoderma spp* y *Pleurotus ostreatus* tanto en medio líquido como en sólido. A partir de los resultados, se realizó la selección del microorganismo más eficiente y finalmente, se inició con la Fase III en la empresa. A continuación, se discutirán los resultados obtenidos en cada Fase establecida:

### 6.1. Fase 1. Resultados Ensayos Medio líquido

#### 6.1.1. Análisis Cuantitativos

##### 6.1.1.1. pH

Como parte de los análisis realizados se encuentra las mediciones semanales de pH, las cuales se muestran detalladas en el Cuadro 7. Las mediciones de pH son de importancia ya que este determina la disponibilidad de nutrientes que necesita el microorganismo para un crecimiento adecuado dentro de los ensayos. Es importante destacar que dentro de la literatura Valderrama (2013), menciona que los hongos toleran márgenes de pH entre 5 y 8. Sin embargo, Naher, Siddiquee y Shafawati (2017), indican que el pH óptimo para la degradación adecuada del hongo *Trichoderma spp* es de 4 pero que las especies del género pueden desarrollarse entre un pH de 2.0 a 6,0; en cuanto al hongo *Pleurotus ostreatus* Pineda, Ramos y Soto (2014), mencionan que este presenta un pH óptimo de crecimiento de 5.5.

A partir de lo anterior, es posible identificar dentro de la Figura 6 como influye el pH sobre el desarrollo del hongo dentro de los ensayos GRT y GRP respecto al comportamiento del medio GYM, el cual pasa de un pH de 3.25 en la semana 1 a 7.73 en la semana 8, este incremento del pH se produce debido a la falta de microorganismos que interfieren en su control y que presenta dentro de su composición fosfatos, los cuales se encargan de aumentar el pH un medio básico. Respecto al ensayo GRT, este presenta un comportamiento similar al control G por encima de su pH óptimo de desarrollo, lo cual indica que el microorganismo no logró la estabilización del pH y por ende su desarrollo ideal.

En cuanto al ensayo GRP, es posible observar en la Figura 6 como el hongo *P. ostreatus* en su cultivo líquido pasa de un pH neutro a un pH ácido, presentándose en la semana 5 el pH óptimo de crecimiento según el Cuadro 7. Además, se puede observar como el pH se va estabilizando producto del microorganismo evidenciando el desarrollo adecuado del mismo tal y como se observa en la Figura 12 del apartado 5.1.2.2.

Por su parte, los ensayos GR, GT y GP al ser controles en el ensayo, presentan un comportamiento similar al medio GYM.

#### **6.1.1.2. Temperatura**

La temperatura del cultivo de hongos es un factor muy importante para los microorganismos ya que condiciona su crecimiento y supervivencia (Cervantes, Orihuela, y Rutiaga, 2017). Según Pineda, Ramos y Soto (2014), esta ha sido estudiada en rangos de 7-37°C en dependencia de la cepa y de la región geográfica de donde proceda. En el Cuadro 8 se encuentran los resultados de las mediciones de temperatura realizadas semanalmente en el LHMRH, donde la mínima corresponde a 23°C para el ensayo GT y la máxima de 27°C para el ensayo con el hongo ostra (GRP).

Respecto a los ensayos que contienen el residuo de pinzote en conjunto con los hongos, es posible identificar en la Figura 7 que el ensayo GRP en la semana 5 presenta la mayor temperatura respecto a G y GRT concordando con el resultado de pH óptimo del hongo indicado en el apartado anterior. A partir del comportamiento observado en este ensayo, es posible indicar que conforme la temperatura aumenta cercana a 30 °C influye en la estabilización del pH presentando una actividad de crecimiento positiva para el hongo. No obstante, Pineda, Ramos y Soto (2014) mencionan que los límites óptimos de la temperatura son más estrechos, en general, que los del pH, por lo cual es importante mantener un control de los cambios presentados semanalmente.

En cuanto al ensayo GRT, se muestra como los valores de temperatura son similares a los controles (G en el caso de la Figura 7). Los autores Naher, Siddiquee y Shafawati (2017), mencionan que para un desarrollo de la biomasa fúngica del *Trichoderma spp* este debe de encontrarse en un rango de temperatura de 10-40 °C y según el Cuadro 8 la temperatura del ensayo GRT se encuentra entre 24 y 26 °C, estando sobre el rango establecido para su crecimiento.

#### **6.1.1.3. Actividad enzimática por Glucosa**

La actividad enzimática fue analizada con respecto a los resultados obtenidos en los análisis de glucosa llevados a cabo el día 0 con respecto a los 30 días del ensayo lo cual se puede observar en la Figura 8 del apartado 5, dicha prueba radica en la composición del residuo de palma africana, constituido por tres principales componentes los cuales son: celulosa, hemicelulosa y lignina, siendo la celulosa un homopolímero lineal de unidades de glucosa ligados mediante enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4, por su parte la hemicelulosa es un heteropolisacárido (Tovar, 2013). Las mediciones de glucosa en el ensayo se fundamentan en el proceso llevado a cabo durante la degradación, ya que primeramente se debe de remover la lignina y la hemicelulosa de manera que el polímero de celulosa quede expuesto para que se logre transformar en unidades de glucosa.

Como se observa en la Figura 8, existe una evidente reducción de glucosa en las muestras inoculadas con el hongo *P. ostreatus*, debido a que al inicio del ensayo esta se encontraba con una concentración cercana a 1000 ug/ml y al transcurrir los 30 días disminuyó considerablemente alcanzando 200 ug/ml aproximadamente, mostrando un consumo por parte del hongo ostra. Dicho comportamiento se debe a que el microorganismo se alimenta de la glucosa libre presente en el medio GYM la cual ha sido hidrolizada por el agua. Según Valdés (2018), ciertos hongos de podredumbre blanca pueden emplear oligómeros de celulosa como fuente de carbono, generando actividad enzimática y reduciendo las concentraciones de glucosa, lo que relaciona la baja concentración con el desarrollo exponencial del hongo.

Analizando la misma figura, se muestra como el ensayo cultivado con *Trichoderma spp* posee concentraciones bajas de glucosa tanto en el inicio como a los 30 días debido a que la inoculación de dicho hongo se realizó de forma líquida generando una dilución de la glucosa y por ende una menor hidrólisis, además no se evidencia una reducción marcada lo cual se relaciona con el poco crecimiento del hongo sobre la fibra de pinzote.

#### **6.1.1.4. Análisis de Lignina**

La lignina es el segundo polímero más abundante en el mundo vegetal, dentro de las funciones que cumple se destacan el brindar rigidez a la pared celular, servir de protección ante agentes atmosféricos y de ataques por parte de microorganismos, también dicho polímero actúa como un elemento de unión de las fibras celulósicas (Neyra, 2021). Al ser la lignina un agente protector complica la degradación de los sustratos que la poseen, principalmente por dos aspectos, el primero es que el patrón del polímero es muy complejo y contiene una gran cantidad de enlaces químicos diferentes y ramificados y el segundo se debe a que la impregnación por parte de lignina a las paredes celulares genera que la estructura sea tan compacta que las moléculas grandes no puedan penetrar (Henríquez,2022).

Datos teóricos indican que los hongos de podredumbre blanca poseen complejos enzimáticos que agilizan y estimulan la ruptura de uniones dentro de la molécula de lignina reduciendo el tamaño de la misma, para el caso específico del hongo *P.ostreatus* se ha reportado que la biomasa fúngica de este, degrada lignina junto con la celulosa, gracias a la facultad de producir enzimas lignocelulíticas oxidativas e hidrolíticas, por lo que comúnmente se utiliza residuos agroindustriales para su cultivo (Matus, 2021).

El hongo *Trichoderma spp*, posee cualidades degradadoras ya que puede descomponer sustratos muy complejos como lo son la pectina, almidón y celulosa, lo anterior se debe al complejo enzimático que contiene el hongo de las cuales se encuentran enzimas hidrolíticas,

amilasas, pectinasa y celulasas, la segregación de la enzima celulasa contribuye a la descomposición de la celulosa a monómeros de glucosa (Geovanni,2019).

Al comparar los resultados obtenidos en el cuadro 10 se evidencia que después de la exposición de la fibra de palma africana a cada hongo evaluado, el porcentaje de lignina presente fue mayor para el ensayo inoculado con ostra dando un resultado de 7,91% mientras que el resultado de lignina para el ensayo con *Trichoderma* fue de un 1,97%. Es importante considerar que el valor teórico de la fibra sin tratamiento es de 25,7%, por lo que el microorganismo con mayor degradación de lignina es el *Trichoderma sp* considerando únicamente los valores arrojados en este análisis.

Según lo mencionado precedentemente y los datos encontrados en la literatura, los resultados obtenidos no son concluyentes debido a que se esperaba un mayor porcentaje de degradación de lignina por parte del hongo *P.ostreatus* en comparación con el *Trichoderma sp*, ya que teóricamente el primer hongo mencionado posee mayores características que facilitan este proceso como lo son los complejos enzimáticos, además en el análisis cualitativo efectuado se evidenció mayor presencia del hongo ostra y una disminución del volumen de la fibra de palma africana, así como resultados cuantitativos en donde es dicho hongo el que alcanza un pH óptimo para su crecimiento.

## **6.1.2. Análisis cualitativos**

### **6.1.2.1. Codificación y fotografías del desarrollo de los hongos**

Durante el desarrollo de la fase I se realizó un seguimiento continuo de manera cualitativa de los diferentes ensayos llevados a cabo, evidenciando los cambios y el comportamiento de estos. Al observar el Cuadro 12 del apartado 5.1.2 se aprecia como al pasar las semanas, los blancos constituidos por residuo y medio GYM no presentaron indicios del hongo lo cual fue un resultado esperado al no estar inoculados, mientras que los medios GYM inoculados con los hongos si evidenciaron presencia de los microorganismos ya que tanto la muestra 8GT3 y GP3 se encuentran invadidas por cada respectivo hongo.

En cuanto a los ensayos constituidos por residuo, medio GYM y hongo, indicados en el Cuadro 13 del apartado 5.1.2.1, el ensayo 8GRT.6 en la semana 1 tenía una presencia de *Trichoderma spp* baja y al pasar el tiempo esta disminuyó hasta alcanzar presencia nula en la semana 8. Lo anterior se evidencia claramente en la Figura 9 en donde se compara por medio de fotografías el desarrollo del ensayo con respecto al paso del tiempo, en este caso en particular se observa como la fibra no ha cambiado físicamente presentando la misma coloración y tamaño

desde la semana 1 hasta la 8, por lo tanto, no se presenta ningún indicio de *Trichoderma* en el residuo. Por su parte, el ensayo 8GRT.3 muestra presencia media del hongo desde la semana 2 hasta alcanzar la semana 8 siendo esta constante. En la Figura 11, es observable la colonización llevada a cabo por el microorganismo, en este caso se evidencia un leve cambio de color del residuo y una evidente presencia de esporas verdes correspondiente al hongo. Por otra parte, es importante recalcar que ninguna muestra inoculada con *Trichoderma* alcanzó una presencia alta en el residuo ya que como se muestra en el Cuadro 13 ninguno de estos ensayos alcanza una codificación de 3 referente a una alta presencia de este.

Con respecto a los ensayos inoculados con *P. ostreatus* en el Cuadro 13 se puede demostrar que en su mayoría este hongo ha logrado colonizar de manera efectiva la fibra, en el ensayo GRP1 se observa como este para la semana 4 posee una presencia alta obteniendo una codificación 3, la cual se mantiene hasta la octava semana y donde dicho comportamiento se repite para las muestras GRP3, GRP4, GRP5 y GRP6, mientras que la muestra GRP2 en la semana 4 alcanza un grado de presencia de 1 y al llegar la semana 8 esta disminuye a un 0. Este comportamiento se puede corroborar en la Figura 11 en donde se muestra una presencia nula en la semana 8 y ningún cambio evidente en las características físicas de la fibra.

Al observar la Figura 12 y compararla con la Figura 13, siendo estos los mejores ensayos para cada tipo de hongo, se observa como el hongo ostra genera una mayor invasión en la fibra cubriéndola completamente, por su parte el *Trichoderma* si ha logrado invadir el sustrato y colonizarlo, pero no completamente como se esperaba.

## **6.2. Fase 2. Ensayos Medio sólido**

### **6.2.1. Análisis Cuantitativos**

#### **6.2.1.1. pH**

El pH del suelo es un factor de importancia debido a que influye directamente en el crecimiento de los microorganismos, en la Figura 14 del apartado 5.2.1.1 se puede evidenciar como el pH de la fibra enterrada (BE) posee un comportamiento similar a la fibra enterrada inoculada con *Trichoderma* (8ME), en ambos casos los resultados de dicho parámetro aumentan levemente manteniéndose dentro de un rango de 6 a 7 lo que los categoriza dentro de un suelo de pH neutro. Por su parte los resultados obtenidos en la Figura 15 muestran como el ensayo que contiene el hongo inoculado en la fibra según la metodología de montículo (8MM) se posiciona con un pH moderadamente ácido a diferencia del blanco en montículo (BM) que se encuentra catalogado en un rango de pH neutro.

Cada grupo de microorganismos posee un pH óptimo de crecimiento y multiplicación, en el caso de la actividad bacteriana se reproduce a un pH de 6,0-7,5; mientras que la mayoría de la actividad fúngica se produce a pH 5,5-8,0 (Martínez, Pantoja y Román, 2013). En el caso específico del hongo *Trichoderma spp* para llevar a cabo un adecuado desarrollo es necesario que el pH sea de 4 es decir, ambientes ácidos lo que interfiere e inhibe su crecimiento (Siddiquee, Shafawati y Naher, 2017). Según Gómez (2017), el hongo *Trichoderma* posee la cualidad de cambiar el pH del ambiente circulante para poder proporcionar condiciones óptimas en la producción de metabolitos, como se muestra en el Cuadro 14 apartado 5.2.1.1, el ensayo inoculado con hongo no mostró una variación significativa en donde se evidencie esta cualidad mencionada anteriormente, esta poca capacidad de variación del pH se encuentra relacionada con el escaso crecimiento de este.

#### **6.2.1.2. Temperatura**

La temperatura es un factor que demuestra el proceso de degradación y las fases en que este se encuentra, en métodos de descomposición como lo es el compostaje se menciona que las temperaturas inician a condiciones ambientes y van en aumento hasta alcanzar los 65°C sin necesidad de calentamiento externo y luego sigue su fase de maduración en donde se disminuye hasta lograr nuevamente temperatura ambiente (Martínez, Pantoja y Román, 2013). Al observar el Cuadro 15 dentro del apartado 5.2.1.2 es evidente como los dos estudios expuestos con el hongo *Trichoderma spp* han mantenido variaciones similares en la temperatura con rangos que van desde los 22- 24°C lo que evidencia que no se logró ese proceso cambiante de temperatura que indica la degradación de materia orgánica.

Por otro lado, los valores de temperatura de los análisis que contienen presencia de hongo en comparación a los que no tienen presencia alguna, muestran variaciones similares, lo cual es visible en la Figura 16, en donde claramente se demuestra una semejanza entre las condiciones, teniendo en este caso las mismas variaciones el BE con respecto a 8ME y de igual manera el BM con 8MM, lo que refuerza el hecho de la poca presencia del hongo en la fibra y su escasa degradación evidenciada de manera cualitativa con respecto a los análisis cuantitativos de parámetros fundamentales como temperatura, humedad y pH.

Las temperaturas bajas menores a 35°C se pueden generar por diversos factores como lo es la falta de humedad (Martínez, Pantoja y Román, 2013), lo cual tiene estrecha relación con los resultados alcanzados en este parámetro, relacionando la Figura 16 con respecto a la Figura 17 se puede observar cómo existe un escaso porcentaje de humedad a bajas temperatura. Por su parte la

temperatura de los sustratos es un factor importante para el desarrollo de los organismos, como se mencionó anteriormente el hongo *Trichoderma spp* se puede desarrollar a un rango entre 10-40 °C lo que indica que este si se encuentra dentro de un rango aceptable, descartando la temperatura como un factor que influyó en el crecimiento de este.

### **6.2.1.3. Humedad**

La humedad del sustrato está directamente relacionada con la disponibilidad de agua en el medio, al ser un factor muy importante para la actividad microbiana y fúngica, generalmente la actividad mínima de agua para una adecuada germinación de este hongo es menor que la del crecimiento micelial. Sin embargo, el límite mínimo de agua para la actividad biológica es variable según otros parámetros como lo es el pH y la temperatura, también la disponibilidad de agua en el suelo es un aspecto que influye en la misma, el hongo *Trichoderma spp* crece de manera óptima en porcentajes de humedad que se encuentren entre 70-80% (Gómez, 2017). Como es observable en la Figura 17 dentro del apartado 5.2.1.3, en el caso del ensayo 8ME se alcanza un porcentaje de humedad dentro del rango óptimo en la semana 2, pero seguidamente este decae llegando a un valor cercano a 40%, proporcionando como resultado una limitante en cuanto a humedad.

En el caso de 8MM este no alcanza datos superiores al 30% en todas las semanas de exposición, al contrario debido a que en la semana 2 este dato tiende a disminuir levemente, la limitante de humedad es un factor que podría haber influenciado el poco crecimiento y producción del hongo *Trichoderma* en la fibra de pinzote, debido a que como se mencionó los porcentajes se encontraban bajos en comparación al dato de humedad óptima del hongo; cabe recalcar que durante el ensayo se realizó adición de agua dos veces por semana aproximadamente para aumentar la humedad del ensayo.

Por su parte, en el Cuadro 16, se muestra como los ensayos BE y BM poseen un comportamiento similar en cuanto al porcentaje de humedad ya que para ambos casos se inicia con humedad cercana a un rango de 30% a 40% para posteriormente aumentar significativamente a un rango de 50%-60%, para llegar a un punto de declive con porcentajes aproximados a 30%. Un comportamiento similar se evidencia en el ensayo con hongo enterrado (8ME), solo que, en este caso en particular, la disminución del porcentaje de humedad es evidente desde una semana antes a los porcentajes mencionados. Por otra parte, el ensayo que posee hongo y fibra en forma de montículo demuestra un comportamiento distinto, ya que la humedad comienza a disminuir en la segunda semana para posteriormente aumentar levemente y seguir de forma constante.

En cuanto a la humedad, Martínez, Pantoja y Román, (2013), mencionan que para alcanzar una degradación de sustratos hasta un nivel de compostaje es necesario que el porcentaje de

humedad se encuentre cercano a 55%, aunque este puede variar según el estado físico y el tamaño del material, si la humedad disminuye por debajo de 45% se reduce la actividad microbiana lo que genera que no se completen las fases de degradación. Es importante también mencionar el caso contrario, es decir en donde la humedad alcanzada es alta o superior a 60%, debido a que se genera una saturación de los poros afectando la oxigenación del material y del calor metabólico, así como proporcionar un ambiente idóneo para la contaminación con bacterias u otros organismos no deseados. Además, desde el punto ambiental se debe de considerar que el agua es un recurso escaso por lo que si se emplea volúmenes altos aumenta el impacto negativo del proceso y mayores costos productivos (Pineda, Ramos y Soto, 2014).

#### **6.2.1.4. Relación C/N**

Los cálculos de relación C/N son uno de los métodos más empleados en los cuales se determina el grado de mineralización de un material orgánico, es decir, el proceso biológico de conversión de materia orgánica a un estado inorgánico por acción de microorganismos. Al ser los análisis de carbono y de nitrógeno de gran importancia en el desarrollo de los hongos por formar parte de los elementos necesarios en la vida y reproducción de los mismos, autores como Figueroa, Álvarez, Forero, Salamanca y Pinzón (2012) así como Castañeda, Méndez, Robles y Ruíz, (2018) indican que la degradación de los residuos lignocelulósicos y la disponibilidad de nutrientes está ligado a la relación C/N donde el valor o rango óptimo para compostaje es del 25-30. Cabe destacar que una relación mayor a 30 se traduce a un proceso de descomposición lento y con baja disponibilidad de nitrógeno mientras que una relación C/N menor a 25 indica mayor contenido de nitrógeno disponible, así como mayor velocidad y magnitud de descomposición. Por otra parte, Cabrera, Díaz, Galeano Gamarra y Ortiz (2017), mencionan que las reducciones de relación C/N indican una mineralización y ruptura de tejidos rápida, ya que la actividad microbiana se estimula, por ende, se genera una mejor degradación de los residuos.

Como se muestra en el Cuadro 17 del punto 5.2.1.4, los análisis realizados durante el primer mes de ensayo presentan como resultados una relación Carbono/Nitrógeno inferior a 25 lo que en primera instancia significa presencia de degradación del residuo por parte el hongo, sin embargo, esto no está siendo concluyente respecto al análisis cualitativo del ensayo 8MM ya que en el transcurso de las semanas se presentó una inhibición en el crecimiento del hongo y su presencia durante la semana 4 es mínima.

En lo que respecta a los ensayos en metodología enterrada, estos también presentan una relación C/N por debajo de 25. En la Figura 20 dentro del apartado 5.2.1.4 es posible contemplar

el comportamiento de estos ensayos en los cuales el Suelo y BE presentan una disminución dentro de su relación C/N mientras que el ensayo 8ME presenta un considerable aumento en la semana 4 pero debido a que este se encuentra bajo una metodología enterrada por 8 semanas no es posible indicar cualitativamente si este incremento es por acción del hongo o si por el contrario este aumento corresponde a la inhibición del hongo y su capacidad de descomponer el residuo en el cual se cultivó.

Al observar la Figura 21 y siguiendo con el ensayo en montículo 8MM este presenta un comportamiento similar al suelo, donde es posible fundamentar la inexistencia cuantificable de degradación pertinente del residuo por parte del hongo. Por su parte, el ensayo BM presenta un incremento importante de su relación C/N en la semana 4 con respecto a la semana 1, sin embargo, este se puede fundamentar por la presencia de algún microorganismo ajeno al ensayo o por algún material proveniente en la fibra utilizada ya que este corresponde a un blanco que no se le aplicó el hongo *Trichoderma spp* ni se esterilizó.

Por otra parte, es posible señalar que dentro de las dificultades presentadas en el desarrollo del hongo sobre el sustrato fibra de pinzote se puede señalar la presencia de nitrógeno dentro del ensayo ya que, según Castañeda, Méndez, Robles y Ruíz (2018), este es necesario para que los hongos se desarrollen y se mantengan activos caso contrario si este tiene baja disponibilidad de N. Por otro lado, se mencionada que, a mayor contenido de N disponible, se da una producción en exceso de N inorgánico, que puede perderse por volatilización en forma de amonio o por lixiviación en forma de nitrato. En el caso del estudio en cuestión, el nitrógeno estuvo presente, pero en condiciones mínimas afectando el desarrollo ideal del hongo.

En cuanto a estudios realizados del hongo *Pleurotus ostreatus* en medio sólido, se indica que el resultado positivo se obtuvo en la metodología fase oscura, en la cual el hongo se desarrolló en un contenedor en condición enterrada y montículo por 60 días sin la interferencia de la luz solar (Balladares y Flores, 2018).

El ensayo que correspondió a metodología enterrada con el hongo ostra obtuvo la mejor degradación en el estudio. Este ensayo presentó una disminución en la relación C/N durante el tercer análisis siendo en esta semana en donde se presentó una mayor degradación de residuo. Además, los resultados cualitativos indicaron las diferencias presentadas respecto al blanco donde este no presenta ninguna degradación o cambio aparente al no tener ningún tratamiento pasados los dos meses de ensayo mientras que en la muestra enterrada fue evidente la diferencia de compactación y de degradación del residuo afectando su textura, su color y su olor (Ver Figura

18). Por su parte, el ensayo realizado bajo condiciones de poca luz y el residuo en forma de montículo mostró resultados positivos en degradación y la proliferación del hongo, esto fue evidente en el desarrollo de los análisis, donde a nivel cuantitativo el ensayo mostró una disminución de C/N en el segundo análisis coincidiendo esta conducta con la semana de mayor producción del hongo y a nivel cualitativo se demostró como el micelio iba colonizando la fibra durante su desarrollo (ver Figura 19). (Balladares y Flores, 2018).

## **6.2.2. Análisis Cualitativos**

### **6.2.2.1. Fotografías**

En el proceso del ensayo en medio sólido con el microorganismo *Trichoderma* se desarrolló un seguimiento cualitativo, el cual evidenció una escasa presencia del hongo en la fibra siendo esto visible en la Figura 22 del apartado 5.2.2.1, en donde al comparar el ensayo en la semana 1 con respecto a la semana 6, no se muestra indicios del microorganismo en el residuo de pinzote. En cuanto a las características de la fibra se puede observar como esta se muestra seca y con una coloración más pálida debido a la limitante de humedad que presenta. En lo que se refiere a la Figura 23 es posible observar el ensayo con fibra sin microorganismos donde se evidencia un comportamiento similar a la fibra que contenía el hongo y por ende la falta de comportamiento ideal de degradación del hongo en el residuo estudiado.

## **6.3. Fase 3. Prueba piloto en campo**

### **6.3.1. Análisis Cuantitativos**

#### **6.3.1.1. pH**

Existen diversos factores involucrados en la descomposición de la materia orgánica, según Ruiz (2020) pueden ser la presencia y acción de microorganismos, el origen de materia orgánica, así como los diversos parámetros de los cuales destacan la temperatura, pH, humedad, disponibilidad de oxígeno y relación C/N, es fundamental entender la afectación que produce el entorno a dicho proceso y a los microorganismo que se interrelacionan, por lo cual el análisis de pH se realizó como un parámetro necesario para la evaluación de la degradación de la fibra de palma africana en la fase 3 siendo este el ensayo en campo.

En la degradación de materia orgánica, específicamente en el compost, el pH presenta una curva típica llevada a cabo por tres sistemas, en donde se evidencia un declive en la fase inicial, un aumento en la fase máxima y posteriormente tiende a estabilizarse (Brenes et al., 2019), como se

muestra en la figura 24, al evaluar el comportamiento del pH en los ensayos inoculados con *P. ostreatus* se evidencia como estos poseen un comportamiento lineal, sin presentar picos o declives significativos que representen la curva de degradación.

Al observar el cuadro 18, se evidencia como los ensayos que cuentan con la presencia del hongo poseen un pH dentro del rango de 8 a 9 siendo estos alcalinos, mientras que el potencial de hidrogeno óptimo para el desarrollo del hongo *Pleurotus ostreatus* es de 5.5 (Pineda, Ramos y Soto, 2014). Como se visualiza en la figura 24, los ensayos sin analito con hidratación presentan un grado mayor en el potencial de hidrógeno en comparación de los ensayos inoculados e hidratados, aunque en ambos casos los pH son alcalinos. Por su parte, al comparar el ensayo inoculado en seco con respecto al blanco bajo las mismas condiciones se muestra un comportamiento similar.

Por lo tanto, a partir de los resultados analizados anteriormente, es posible identificar que el pH del sustrato durante el ensayo de campo no propició un ámbito ideal para el crecimiento adecuado del hongo *Pleurotus ostreatus*.

#### **6.3.1.2. Temperatura**

En el proceso de degradación de residuos agroindustriales como es el de la palma africana la temperatura juega un papel fundamental, ya que el aumento de este factor favorece la degradación de los enlaces de lignina (Das et al., 2017), logrando de esta manera que se encuentren disponibles para la degradación microbiana. En el desarrollo del ensayo realizado en campo se evidencia en la figura 25 como la temperatura más alta lograda fue de 30,13°C para el ensayo que contenía *P. ostreatus* sin adición de agua (FPS), dicho valor fue alcanzado la segunda semana del ensayo, sin embargo, este parámetro presentó un comportamiento de declive al pasar la tercera y cuarta semana.

En el cuadro 19 se observa como el ensayo con presencia de *P. ostreatus* que obtuvo menor temperatura corresponde a FPS en la semana cuatro siendo esta de 27,5°C, al comparar dicho ensayo con el blanco se observa que las temperaturas en ambos casos son similares, en estas pruebas se evidencia como para la última semana del estudio existió un aumento de la temperatura.

El cultivo de *P. ostreatus* depende de diversos factores tanto intrínsecos como lo son el sustrato, el pH, la relación C: N y humedad, así como los extrínsecos existiendo entre ellos la temperatura, la humedad relativa, la composición del aire y la luz (Abdalla et al, 2022). El hongo

ostra puede llegar a desarrollarse en ambientes con temperaturas que se encuentren entre los 23 a 32°C, siendo la temperatura óptima los 28°C para el crecimiento micelial (Bardales et al, 2019). Los ensayos que fueron inoculados con el hongo seleccionado (FPS y FPH) para la tercera etapa alcanzaron la temperatura óptima de crecimiento micelar en la tercera y quinta semana como se observa en la figura 25.

### **6.3.1.3. Humedad**

Según Ruiz (2020), el agua por medio de la hidrólisis da inicio al proceso de degradación, generando un medio necesario para lograr el transporte y la transformación de los nutrientes, los cuales serán necesarios para la realización de las actividades metabólicas y fisiológicas de los organismos, por lo que el porcentaje de humedad en los sustratos es un parámetro que influye directamente en los procesos de descomposición.

Al observar la figura 26 se logra apreciar que los resultados del porcentaje de humedad obtenidos en los diferentes ensayos evaluados se encuentran dentro de un rango de 28 a 57%, estos resultados están por debajo del porcentaje de humedad teórico para sustratos, el cual según Bardales et al, (2019) se estiman entre 60 a 70%, lo que demuestra que el resultado obtenido no fue el óptimo para generar las condiciones adecuadas que propiciarán el proceso de degradación.

En la figura 26 se observa como en las primeras dos semanas el montaje FBH presenta mayor humedad en comparación con el ensayo FPH, mientras que en la tercera semana se observa un aumento de la humedad para FPH sobrepasando al blanco en las mismas condiciones. Por su parte los ensayos sin adición de agua presentan un comportamiento contrario debido a que en las primeras dos semanas FPS presenta mayor porcentaje de humedad en comparación con FBS y a partir de la tercera semana es el blanco el que presenta resultados más altos en humedad.

Al evaluar todos los montajes realizados en campo, se puede distinguir en la figura 26 como FBS obtuvo el menor porcentaje de humedad durante todo el periodo del ensayo siendo este de 28% como dato obtenido en la segunda semana, en dicha semana se evidenció un considerable declive de humedad para todas las pruebas, lo cual está directamente relacionado con la escasa presencia de precipitación de la zona. La disminución del porcentaje de humedad afecta directamente la degradación ya que disminuye la actividad microbiana y la acción biológica de los organismos (Muswati, C et al, 2021).

Como se muestra en la figura 26 existió un pico en el porcentaje de humedad en la tercera semana en todos los montajes, obteniendo FBS la mayor humedad de un 57% seguido de FPS con un 56% y por FPH con un 55%. En el cuadro 20 se muestra como los ensayos inoculados con *P. ostreatus* presentan un aumento en humedad al comparar la primera semana de montaje con respecto a la quinta semana, FPH fue el que presentó un aumento sustancial.

### 6.3.2. Análisis Cualitativos

#### 6.3.2.1. Fotografías

Los ensayos de la tercera fase se realizaron en los terrenos de Compañía Palma Tica S.A en el área de investigación. Como se observa en la Figura 27 se realizaron cuatro tipos de métodos, de los cuales dos se basaron en blancos tanto secos como húmedos (FBS y FBH) y dos en la aplicación del hongo, de igual manera bajo las condiciones seco y húmedo (FPS y FPH).

A continuación, se desarrollarán los principales resultados identificados en campo en el desarrollo del ensayo:

Durante los primeros días de la investigación, se evidencia la presencia del hongo identificado como *Neurospora crassa*. En el desarrollo del estudio en laboratorio realizado por Balladares y Flores (2018) se indica que el hongo se produce en la fibra al estar expuesta en el ambiente, debido a los niveles de aceite que aún esta contiene. Como se observa en la figura 28 este hongo tiene como principal característica el color naranja intenso, que permite identificarlo a simple vista en los primeros días a partir de que la fibra sale del proceso de extracción de aceite como parte del residuo o subproducto generado. Sin embargo, con forme pasan las semanas *N. crassa* va disminuyendo su tonalidad hasta convertirse en un tipo moho de color blancuzco. Según Gil (2017), el *Neurospora crassa* es un hongo filamentoso perteneciente a la clase Ascomiceto, conocido como un hongo con esporas naranjas contaminante del pan. Además de ser considerado en la naturaleza como un microorganismo capaz de colonizar la vegetación quemada debido a que utiliza la celulosa en su metabolismo y necesita calor para la germinación de sus ascosporas en la reproducción sexual. Lo anterior, se evidencia en la aparición del *N. crassa* en la fibra una vez que esta pasa por el proceso de altas temperaturas para extraer el aceite.

Por otra parte, en la Figura 29 se observa el comportamiento de los ensayos considerados como blancos mediante la comparación desde el día 1 hasta la semana 5 de estudio. Según los análisis cualitativos semanales, el ensayo FBS durante la primera semana presentó una invasión del hongo *N. crassa*, durante la segunda semana se evidenció una reducción del hongo naranja y la aparición de un tipo de moho blanco debido a que la humedad de la fibra aumentó durante esa

semana. En el caso del ensayo FBH, durante la primera semana presentó una invasión de *Neurospora* considerablemente hasta la segunda semana de estudio, a partir de la tercera semana no se observó la presencia del hongo a pesar de que la humedad del ensayo aumentó. En el caso de los ensayos FBS y FBH, es posible observar en la Figura C que no se presentó una reducción o degradación importante en la fibra lo cual es el comportamiento esperado siendo el blanco.

Para el caso de los ensayos inoculados con el hongo *P. ostreatus*, en la figura 30 se presenta el comportamiento del ensayo FPH con menor presencia del hongo. En este caso, durante la semana 1 la presencia del hongo invasor fue muy baja en comparación con los blancos, en la segunda semana se observó un desarrollo mínimo del hongo aplicado y a partir de la tercera semana se inhibió el crecimiento y desarrollo del micelio del *P. ostreatus*, por lo que no es posible observar una diferencia representativa de comportamiento de la semana 2 a la 4, esto se complementa con los resultados de pH alcalino y bajo % de humedad mencionados anteriormente. En el caso del FPS con menor presencia de hongo, durante la semana 2 se identifica en la Figura 31 una alta presencia del hongo *N. crassa*, que disminuyó a partir de la semana 3 así como la reducción de la humedad en la fibra que fue menor a la obtenida por el blanco y por lo tanto se afectaron las condiciones de crecimiento requeridas por el microorganismo seleccionado.

Para el caso de los ensayos con mayor presencia del hongo, en la figura 32 se muestran las evidencias del desarrollo del ensayo FPH, en donde durante la segunda semana se observa presencia del hongo aplicado y del hongo color naranja. En cuanto a la semana 3, se presenta el desarrollo del micelio de *P. ostreatus*, así como la disminución de la presencia del *N. crassa*. Sumado a esto, en esa semana se presentó el crecimiento de un hongo denominado *Comatus coprinus* conocido comúnmente como tinta negra, el cual es un hongo que pertenece al phylum Basidiomycota, familia Agaricaceae y género Coprinus. Este hongo es comestible, pero a diferencia de todos los hongos que igualmente se consideran comestibles, este solo lo es en su etapa joven (como se observa en la semana 2), una vez el hongo se hace viejo con el paso de las semanas, las esporas y la himenia se transforman mediante el proceso de autodigestión en un fluido como la tinta que oscurece al Coprinus. Además, dicho hongo presenta su propia actividad antifúngica sobre algunas especies de hongos y tiene un crecimiento micelial favorable a una temperatura de 26 °C y un pH de 7 (Nowakowski et.al, 2019), por lo tanto, se considera que dicho hongo interfirió con la inhibición del desarrollo del hongo ostra.

En cuanto al ensayo con mayor presencia del hongo *P. ostreatus* se encuentra el FPS, en la figura 33 es posible identificar como a partir de la semana 2 se observa el desarrollo del micelio

en el interior de la fibra, en la semana 3 se evidencia mayor colonización del sustrato y durante la semana 4 se muestra la continuación de la presencia del hongo aplicado en el campo. Esto se complementa con los resultados de temperatura óptima durante la semana tres y cinco.

En general, en cuanto a la lenta colonización del hongo seleccionado y baja degradación respecto a los blancos, se puede identificar que la fibra presenta un alto contenido de aceite y falta de nitrógeno para brindar condiciones adecuadas que permitan un crecimiento óptimo del microorganismo

## 7. CONCLUSIONES

En la fase líquida el hongo que presentó mayor presencia a partir de la prueba in vitro en la fibra de palma africana fue el *P. ostreatus* el cual logró alcanzar una codificación de tres, siendo este el microorganismo más eficiente, caso contrario para el hongo *Trichoderma spp* el cual logró niveles de presencia bajos y medios.

Los residuos de *E. guineensis* resultaron no ser favorables para el efectivo desarrollo del hongo *Trichoderma spp* observándose un pobre y casi nulo crecimiento del micelio en la fase sólida del estudio, mediante las pruebas físicas y químicas realizadas.

A partir de la realización de la prueba piloto se concluye que el microorganismo seleccionado requiere de un medio inicial que le suministre nutrientes que le permita realizar el proceso de degradación continua, ya que este al ser expuesto a un sustrato en donde no pueda obtener los nutrientes necesarios de una manera rápida imposibilita su germinación y desarrollo óptimo.

La interacción de los parámetros propios de la zona como lo son el pH, la temperatura, humedad y la interacción con otros organismos afectó directamente el ensayo en campo, debido a que el hongo seleccionado en la fase tres se enfrentó a dichas condiciones; además, compitió nutricionalmente con otros hongos que invadieron el ensayo como lo fueron el *Comatus coprinus* y el *Neurospora crassa*.

En cuanto al planteamiento del problema y la pregunta generada en la investigación se concluye que, si es posible degradar los residuos con estructuras lignocelulósicas, es el caso de los residuos de palma aceitera; sin embargo, para obtener una degradación completa es necesario mantener un control operativo de las condiciones de humedad, pH y temperatura óptimas para el crecimiento del microorganismo ya que estos parámetros interfieren directamente en la disponibilidad de nutrientes y condiciones que requieren los mismos.

La aplicación de procesos biotecnológicos en pro de reducir y proteger el ambiente del exceso de residuos sólidos orgánicos actualmente es una necesidad en el sector agroindustrial en donde diariamente se generan residuos con características que dificultan su tratamiento adecuado, por lo que las industrias tienden aplicar productos químicos como una opción rápida para su descomposición.

## 8. RECOMENDACIONES

Para agilizar los procedimientos de degradación de la fibra, es importante que se identifique un proceso de descomposición fisicoquímico o mecánico que anteceda la aplicación del proceso biológico mediante la aplicación de un microorganismo que podría ser el *P. ostreatus*, en menor cantidad de tiempo.

Se recomienda la aplicación de compuestos como cal que permiten mantener un pH constante de los ensayos y favorecer un ambiente de crecimiento adecuado para el *P. ostreatus*.

Realizar otros ensayos empleando diferentes tipos de micro hongos de degradación que no generen cuerpo fructífero, sino que degraden aún más los residuos lignocelulósicos.

Es necesario que para la germinación del hongo este disponga de un medio con nutrientes esenciales, que le permitan sobrevivir a las condiciones ambientales del medio durante las primeras semanas y con ello aumentar la eficiencia de degradación.

Se deben de estudiar e identificar otros métodos más certeros y representativos que evidencien cuantitativamente la degradación de lignina como la microscopía de fluorescencia.

Finalmente, es importante destacar que se deben de realizar esfuerzos dirigidos a la investigación de estas metodologías piloto en las cuales a un mediano plazo se identifiquen y apliquen procedimientos ambientalmente viables para el manejo, tratamiento y aprovechamiento de los residuos agroindustriales como parte de una necesidad del sector en nuestro país.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Abarca, G. (2015). Contexto histórico del cese del enclave bananero en la zona sur de Costa Rica (1972-1985). *Revista Universidad en Diálogo* 5(2), 2215-4752. <http://dx.doi.org/10.15359/udre.5-2.12>
- Abdalla, N., Badgar, K., Eid, Y., Fawzy, Z., Hajdú, P., Llanaj, X., Prokisch, J., Ramady, H y Töros. (2022). Green Biotechnology of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus* L.): A Sustainable Strategy for Myco-Remediation and Bio-Fermentation. *Sustainability*. 14(6), 3667. <https://doi.org/10.3390/su14063667>
- Abril, M. (2016). *Optimización de la reacción de hidrólisis ácida de los residuos de la planta de banano, para mayor rendimiento a glucosa*. [Tesis de grado, Universidad de Cuenca] <http://dspace.ucuenca.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/25974/1/Tesis.pdf>
- Aceves, M., Ayala, A., Barrios, M., Casimiro, A., Flores, A. y Otero, M. (2015). Productos incrementan la producción químicos y biológicos como suplementos que del hongo ostra *Pleurotus ostreatus*. *Interciencia*. 40, (8), 542-548. <https://www.redalyc.org/pdf/339/33940176006.pdf>
- Acosta, A., Chinchilla, C., Torres., R. (2004). Proyecto comercial de compostaje de los desechos agroindustriales de la palma aceitera. *Palmas*. 25, 377-387. <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/palmas/article/view/1103/1103>
- Aguas, M., Chams, L., Cury, K., Martínez, A., Olivero, R. (2017). Residuos agroindustriales su impacto, manejo y aprovechamiento. *Revista Colombiana de Ciencia animal*. 9, 122-132. <https://revistas.unisucre.edu.co/index.php/recia/article/view/530>
- Agüero, S., Buglione, M., Filippi, M., Rodríguez, G., y Martínez, D. (2018). Cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kummer sobre orujo de pera: Evaluación de la productividad y composición química del sustrato biodegradado. *Anales de Biología*, 40. 21-30. <https://doi.org/10.6018/analesbio.40.03>
- Ahuactzin, M., Concepción, M., García, J., González, M., Sánchez, C., Santacruz, E y Tlécuil, S *Biology*. 122(10), 991-997. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2018.07.001>
- Alonso, J., Domínguez, E., Parajó, J., Romaní, A., y Yáñez, R. (2014). A biorefinery approach based on fractionation with a cheap industrial by-product for getting value from an invasive woody species. *Bioresource Technology*, 173. 301-308. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.104>

Arce, J., Fernández., Flores, D., Ramírez., Reyes, J., Rojas, N., Roldán., Uribe, R. y Zegarra, H. (2006). *Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados*. Secretaria de Medio ambiente y recursos Naturales.

Asamblea Legislativa. (1942). Ley de Aguas N°276. San José, Costa Rica.

Asamblea Legislativa. (1974). Ley General de la Salud N°5395. San José, Costa Rica.

Asamblea Legislativa. (1995). Ley orgánica del ambiente N° 7554. San José, Costa Rica.

Asamblea Legislativa. (1997). Ley de Protección Fitosanitaria N°7664. San José, Costa Rica.

Asamblea Legislativa. (2007). Reglamento de Vertido y Reuso de Aguas N° 33601. San José, Costa Rica.

Asamblea Legislativa. (2008). Ley para el Sistema de Banca para el Desarrollo N°8634. San José, Costa Rica.

Asamblea Legislativa. (2010a). Ley para la Gestión Integral de Residuos N°8839. San José, Costa Rica.

Asamblea Legislativa. (2010b). Reglamento a la Ley de Apoyo de Fortalecimiento del sector Agrícola N° 36173. San José, Costa Rica.

Badii, M., Castillo, J., y Cortez, K. (2007). Papel de la estadística en la investigación científica. *Innovaciones de Negocios*, 4(7), 107-145. <http://revistainnovaciones.uanl.mx/index.php/revin/article/view/180/166>

Alsahhaf, Z., Bahareth, O., Hijji, H., Osman, G y Saleh, A. (2018). The Effect of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) as a Microbial Control Agent against *Musca domestica* in Makkah Region. *J Pure App Microbiol*, 12, (4), 2077-2085. <http://doi.org/10.22207/JPAM.12.4.44>

Balladares, M., y Flores, M. (2018). *Diagnóstico integral del manejo del residuo de *Elaeis guineensis* en cuatro plantas extractoras de aceite y evaluación del hongo *Pleurotus ostreatus* como tecnología para su tratamiento* [Proyecto de investigación no publicado] Universidad Nacional.

- Bardales, C., Cabos, J., Casanova, M., Díaz, K., Gil, L y León, C. (2019). Producción de *Pleurotus ostreatus* (Pleurotaceae) ICFC 153/99 cultivado sobre diferentes residuos lignocelulósicos. *Revista del Museo de Historia Natural*. 26(3), 2413-3299. <http://dx.doi.org/10.22497/arnaldoa.263.26322>
- Beggs, E y Moore, E. (2013). El paisaje social de la producción de aceite de palma africana en la región de Osa y Golfito. *Stanford Woods Institute for the Environment*. <https://inogo.stanford.edu/sites/default/files/Palma%20an%C3%A1lisis%20social%20INOGO%20Junio%202013.pdf>
- Benavides, O., Cabrera, É. y Villota, A. (2015). Ácidos grasos del hongo funcional *Pleurotus ostreatus* cultivado en residuos sólidos agroindustriales. *Producción + Limpia*, 10(1), 73-81. <http://www.scielo.org.co/pdf/pml/v10n1/v10n1a07.pdf>
- Billotte, N., Cros, D., Cochard, B., Cuellar, T., Espeout, S., Flori, A. (2014). Genetic architecture of palm oil fatty acid composition in cultivated oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) compared to its wild relative *E. oleifera* (H.B.K) Cortés. *PLOS ONE*, 9(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101628>
- Borawska, M; Markiewicz, R; Naliwajko, S; Nowakowski, P y Socha, K. (2019). The two faces of *Coprinus comatus*—Functional properties and potential hazards. *Phytotherapy Research*. 34, 2932-2944. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/ptr.6741>
- Brenes, L., Campos, R., Chaves, R y Jiménez, M. (2019). Compostaje de residuos sólidos biodegradables del restaurante institucional del Tecnológico de Costa Rica. *Revista Tecnología en Marcha*, 32.1, 39-53. [https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0379-39822019000100039&script=sci\\_arttext](https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0379-39822019000100039&script=sci_arttext)
- Caballero, J., Martínez, M. y Pedraza, A. (2018). Inversión de triple utilidad y educación financiera: un aporte a la sustentabilidad del sector agrícola en américa latina. ANFECA. <http://132.248.164.227/congreso/docs/xxiii/docs/4.08.pdf>
- Cáceres, O., López, F., y Piepenbring, M. (2016). La Importancia de los hongos en los ecosistemas. *Puente Biológico*, 8. 57-91. [https://www.researchgate.net/profile/Meike-Piepenbring-2/publication/321854269\\_Colaboradores\\_escondidos\\_-\\_La\\_Importancia\\_de\\_los\\_Hongos\\_en\\_los\\_Ecosistemas\\_Informacion\\_para\\_Educacion\\_Ambiental/links/5a35334c45851532e82f0fc0/Colaboradores-escondidos-La-Importancia-de-los-Hongos-en-los-Ecosistemas-Informacion-para-Educacion-Ambiental.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Meike-Piepenbring-2/publication/321854269_Colaboradores_escondidos_-_La_Importancia_de_los_Hongos_en_los_Ecosistemas_Informacion_para_Educacion_Ambiental/links/5a35334c45851532e82f0fc0/Colaboradores-escondidos-La-Importancia-de-los-Hongos-en-los-Ecosistemas-Informacion-para-Educacion-Ambiental.pdf)
- Castro, K., Bustamante, D y García, N. (2016). Eficiencia de tratamientos para el control de hongos competidores, durante la producción de cepa comercial de *Pleurotus* spp. *Ciencia y Tecnología*

- Alimentaria*, 14(1), 23-33.  
[https://www.researchgate.net/publication/318659602\\_Eficiencia\\_de\\_tratamientos\\_para\\_el\\_control\\_de\\_hongos\\_competidores\\_durante\\_la\\_produccion\\_de\\_cepa\\_comercial\\_de\\_Pleurotus\\_spp\\_Efficiency\\_of\\_treatments\\_for\\_the\\_control\\_of\\_competitors\\_fungi\\_in\\_the\\_product](https://www.researchgate.net/publication/318659602_Eficiencia_de_tratamientos_para_el_control_de_hongos_competidores_durante_la_produccion_de_cepa_comercial_de_Pleurotus_spp_Efficiency_of_treatments_for_the_control_of_competitors_fungi_in_the_product)
- Cervantes, J., Orihuela, R y Rutiaga, J. (2017). Acerca del Desarrollo y Control de Microorganismos en la Fabricación de Papel. *Conciencia Tecnológica*, (54).  
<https://www.redalyc.org/jatsRepo/944/94454631001/html/index.html>
- Chacón, K., González, V., y Segura, R. (2016). Caracterización y tipología de las fincas agropecuarias de Costa Rica. *Programa Estado de la Nación*.  
[https://estadonacion.or.cr/files/biblioteca\\_virtual/023/Ambientales/Gonzalez-V-et-al-2016.pdf](https://estadonacion.or.cr/files/biblioteca_virtual/023/Ambientales/Gonzalez-V-et-al-2016.pdf)
- Collahuazo, M y Guerrero, G. (2015). *Efecto de la producción de palma aceitera y la elaboración de aceite de palma en Esmeraldas*. [Tesis de grado, Universidad Católica de del Ecuador].  
<http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/9966/Tesis.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Contreras, O., Martínez, M. y Pedraza, A. (2017). La inversión de impacto como medio de impulso al desarrollo sostenible: una aproximación multicaso a nivel de empresa en Colombia. *Estudios Gerenciales*, 33(142). <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0123592317300074>
- Damilare, A., Gbemisola, O., Gbolagade, J., y Kehinde, P. (2018). Fungal and Insect Pests of the Edible Mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Notulae Scientia Biologicae*, 10(3), 379-386.  
<https://www.notulaebiologicae.ro/index.php/nsb/article/view/10284/8976>
- Damodar, G y Dawn, C. 2010. *Econometría*. Mcgraw-hill/Interamericana aditores.  
[https://scalleruizunp.files.wordpress.com/2015/04/econometria\\_-\\_damodar\\_n-\\_gujarati.pdf](https://scalleruizunp.files.wordpress.com/2015/04/econometria_-_damodar_n-_gujarati.pdf)
- Das, S., Kalamdhad, A., Sastri, C y Sudharsun, V. (2017). Microbial degradation of lignocellulosic fractions during drum composting of mixed organic waste, *Sustainable Environment Research*. 27. 265-272. <https://doi.org/10.1016/j.serj.2017.05.004>
- De Paz Santizo, G. (2014). *Control de Mosca Doméstica (Musca domestica) en el raquis de Palma Aceitera (Elaeis Guineensis), diagnóstico y servicios realizados en el municipio de Fray Bartolomé de las casas, Alta Verapaz, Guatemala C.A.* [Tesis de grado, Universidad de San Carlos]. Repositorio USAC.
- Fajardo, A. (2016). *Viabilidad de la degradación del rastrojo de piña (Ananas comosus) inoculado en suelo mediante un consorcio de hongos y bacterias como tratamiento alternativo e impacto en la fertilidad* [Trabajo de grado, sin publicar] Universidad Nacional.

FAO, (2013). *Agroindustrias para el desarrollo*. <http://www.fao.org/3/ai3125s.pdf>

Gálvez, N. (2015). *Participación en la liberación de un parasito de Pteromalidae (Hymenoptera) para el control de mosca doméstica en el cultivo de palma africana, en la empresa Naturaceites, S.A.* [Proyecto de graduación, Universidad Rafael Landívar] <http://recursosbiblio.url.edu.gt/tesisjcem/2015/06/17/Galvez-Nelson.pdf>

Cabrera, A., Díaz, M., Galeano, A., Gamarra, C y Ortiz, M. (2017). Relación carbono-nitrógeno en suelos de sistemas silvopastoriles del Chaco paraguayo. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 9 (46). <https://doi.org/10.29298/rmcf.v9i46.134>

Ganchozo, W y Huaraca, H. (2017). *Guía para facilitar el aprendizaje en el manejo integrado del cultivo de palma aceitera (Elaeis guineensis, Jacq)*. Estación Experimental Santo Domingo.

Garzón, E., Ramírez, N., Silva, A y Yáñez, E. (2011). *Caracterización y manejo de subproductos del beneficio del fruto de palma de aceite (30)*. Fedepalma. <https://publicaciones.fedepalma.org/index.php/boletines/article/view/10502/10492>

Geovanni, R. (2019). *Evaluación de sustratos orgánicos para reproducción de Hongo trichoderma sp.* [Tesis de grado, Universidad Luterana Salvadoreña]. <https://www.uls.edu.sv/sitioweb/images/2022/INVESTIGACION/REPOSITORIO/2019/Evaluaci%C3%B3n%20de%20sustratos%20org%C3%A1nicos%20para%20reproducci%C3%B3n%20de%20hongo%20trichoderma%20sp.pdf>

Gil, M. (2017). *Regulación por la luz de la localización y estabilidad de la proteína VE-1 durante el desarrollo de Neurospora crassa*. [Tesis doctoral, Universidad de Sevilla]. <https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/63961/TESIS%20FINAL%2028%20JUNIO.pdf?sequence=5&isAllowed=y>

Gómez, T. (2017). *Evaluación de diferentes Medios de Cultivo y condiciones para la Producción de Cambios de Trichoderma spp Mediante Fermentación en Medio Líquido y Sólido* [Tesis de grado, Instituto Tecnológico de Costa Rica]. [https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/7079/evaluacion\\_diferentes\\_medios\\_condiciones\\_produccion.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/7079/evaluacion_diferentes_medios_condiciones_produccion.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Henríquez, S. (2022). *Oxidación enzimática de lignina de pulpa mecánica de Pinus radiata D. Don para la producción de lignonnanocelulosa*. [Tesis de grado, Universidad de Concepción]. <http://repositorio.udec.cl/bitstream/11594/9910/1/Sergio%20Henriquez%20Tesis.Image.Marked.pdf>

- Hernández, A., Niño, Z., y Ruilova, M., (2017). Influence of C/N ratio on productivity and the protein contents of *Pleurotus ostreatus* grown in different residue mixtures. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*. 49(2), 331-344. [https://bdigital.uncu.edu.ar/objetos\\_digitales/9699/20172-cp23-ruilova-cueva.pdf](https://bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/9699/20172-cp23-ruilova-cueva.pdf)
- Hernández, G. (2017). Empleo directo e indirecto y elasticidad según actividad económica. *Economía y Sociedad* 22(52). 25-47. [https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2215-34032017000200025](https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2215-34032017000200025)
- Infante, D., Martínez, B., y Pereira, B. (2015). Taxonomía Polifásica y Variabilidad en el Género *Trichoderma*. *Protección Veg.* 30. 11-22. <http://revistas.censa.edu.cu/index.php/RPV/article/view/617/0>
- Instituto Nacional de Estadística y censos. (2015a). *Atlas Estadístico Agropecuario (VI)*. [http://www.inec.go.cr/sites/default/files/documentos/bibliotecavirtual/01\\_atlas\\_estadistico\\_agropecuario\\_2014.pdf](http://www.inec.go.cr/sites/default/files/documentos/bibliotecavirtual/01_atlas_estadistico_agropecuario_2014.pdf)
- Martínez, M., Pantoja, A y Román, P. (2013). *Manual de Compostaje del Agricultor*. FAO. <http://www.fao.org/3/a-i3388s.pdf>
- Martínez, Y. (2014). *Selección de hongos filamentosos con potencial para la degradación de lignocelulosa aislados de desechos agroindustriales de café e higuera*. [Trabajo de Grado, Universidad católica de Manizales] <https://repositorio.ucm.edu.co/bitstream/10839/987/1/Manuela%20Martinez%20Restrepo.pdf>
- Matus, X. (2018). *Producción de Enzimas Hidrolasas Obtenidas por Hongo *Pleurotus ostreatus* en Fermentación Sólida y su Aplicación en el Bagazo Residual de la Industria de Producción de Sidra*. [Tesis de grado, Benemérita Universidad de Puebla] <https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/8223>
- Mejías, N., Orozco, E y Galán, N. (2016). Aprovechamiento de los residuos agroindustriales y su contribución al desarrollo sostenible de México. *Revista de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales*, 2, (6). [https://www.researchgate.net/publication/323959087\\_Aprovechamiento\\_de\\_los\\_residuos\\_agroindustriales\\_y\\_su\\_contribucion\\_al\\_desarrollo\\_sostenible\\_de\\_Mexico](https://www.researchgate.net/publication/323959087_Aprovechamiento_de_los_residuos_agroindustriales_y_su_contribucion_al_desarrollo_sostenible_de_Mexico)
- Merchán, X. (2015). *Control biológico con hongos entomopatógenos: una estrategia de aula para promover el cuidado del medio ambiente* [Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia] <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/56502>

Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2014). Memoria de gestión del sector agroalimentario (2010-2014). [http://www.sepsa.go.cr/DOCS/2014-Informe\\_Gestion\\_SectorAgro\\_2010-2014.pdf](http://www.sepsa.go.cr/DOCS/2014-Informe_Gestion_SectorAgro_2010-2014.pdf)

Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2015). Plan Estratégico (2015-2018). <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/e14-10870.pdf>

Ministerio de Vivienda y Asentamientos Humanos. (2013). *Caracterización del cantón de Golfito, Corredor Fronterizo Zona Sur*. [https://www.mivah.go.cr/Documentos/investigaciones\\_diagnosticos/diagnosticos\\_planes\\_intervencion/2013/GOLFITO/DIAGNOSTICO\\_GOLFITO\\_FRONTERA.pdf](https://www.mivah.go.cr/Documentos/investigaciones_diagnosticos/diagnosticos_planes_intervencion/2013/GOLFITO/DIAGNOSTICO_GOLFITO_FRONTERA.pdf)

Muswati, C., Ngezimana, W., Simango, K y Tapfumaneyi, L. (2021). The Effects of Different Substrate Combinations on Growth and Yield of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *International Journal of Agronomy*, 10. <https://doi.org/10.1155/2021/9962285>

Naher, L., Shafawati, S., y Siddiquee. (2017). Effective Composting of Empty Fruit Bunches Using Potential Trichoderma Strains. *Biotechnology Reports* 13.1-7. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2016.11.001>

Neyra, J. (2021). *Caracterización Química del Escobajo y Fibra de Palma Aceitera (Elaeis guineensis Jacq.) Para Producción de Envases Biodegradables, Distrito de Neshuya, Ucayali 2021*. [Tesis de grado, Universidad Nacional de Ucayali]. <http://repositorio.unu.edu.pe/handle/UNU/5025>

Nugra, A. (2018). *Evaluación de Sustratos Orgánicos para la Propagación del Trichoderma spp.* [Tesis de grado, Universidad Politécnica Salesiana]. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/15121/1/UPS-CT007457.pdf>

Olivero, J., Sierra, J y Sierra, L. (2017). Potencial económico de la palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq). *Agron Mesoam.* 28(2):523-534. [http://www.mag.go.cr/rev\\_meso/v28n02\\_523.pdf](http://www.mag.go.cr/rev_meso/v28n02_523.pdf)

Peñaranda, L., Montenegro, S. y Giraldo, P. (2017). Aprovechamiento de residuos agroindustriales en Colombia. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental.* 8(2), 141-150. [https://www.researchgate.net/publication/327003621\\_Aprovechamiento\\_de\\_residuos\\_agroindustriales\\_en\\_Colombia](https://www.researchgate.net/publication/327003621_Aprovechamiento_de_residuos_agroindustriales_en_Colombia)

Pineda, J., Ramos, L y Soto, C. (2014). Producción de *Pleurotus ostreatus* por fermentación en estado sólido: una revisión. *Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA)*, 48(2) ,13-23. <https://www.redalyc.org/pdf/2231/223131465002.pdf>

Rojas, D. (2015). *Evaluación in vitro de un consorcio de hongos y bacterias sobre la degradación del rastrojo de piña* [tesis de grado no publicado]. Universidad Nacional de Costa Rica.

Ruiz, Y. (2020). *Degradación de residuos orgánicos domésticos a través de un consorcio bacteriano para la formación de una composta* [Tesis de grado, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla]. <https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/11480>

Sánchez, R. (2015). t-Student, Usos y Abusos. *Revista Mexicana de Cardiología*, 29(1), 113-610. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0188-21982015000100009](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-21982015000100009)

Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria. (2018). Informe de Gestión del Sector Agropecuario y Rural (mayo 2014-abril 2018). [http://www.sepsa.go.cr/docs/2018-005-Informe\\_Gestion\\_Sector\\_Agropecuario\\_2014-2018.pdf](http://www.sepsa.go.cr/docs/2018-005-Informe_Gestion_Sector_Agropecuario_2014-2018.pdf)

Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria. (2019). Boletín Estadístico Agropecuario (19). <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/BEA-0029.PDF>

Serrano, A. (2015). *Tratamientos de residuos y subproductos agroindustriales mediante codigestión anaerobia*. [Tesis doctoral, Universidad de Córdoba]. <https://pdfs.semanticscholar.org/61af/e9ebf6b214d6f6e8e7b127bd50b440224eea.pdf>

Shafawati, S. N., y Siddiquee, S. (2013). Composting of oil palm fibers and *Trichoderma* spp. as the biological control agent: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation, El Sevier*. 85, 243- 253. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.08.005>

Tovar, O. (2013). *Evaluación de un material lignocelulósico para la producción de celulasas, xilanasas y lacasas por basidiomicetos del noreste de México* [Tesis de grado, Unidad Autónoma de Nuevo León]. [https://www.researchgate.net/publication/274899216\\_EVALUACION\\_DE\\_UN\\_MATERIAL\\_LIGNOCELULOSICO\\_PARA\\_LA\\_PRODUCCION\\_DE\\_CELULASAS\\_XILANASAS\\_Y\\_LACASAS\\_POR\\_BASIDIOMICETOS\\_DEL\\_NORESTE\\_DE\\_MEXICO](https://www.researchgate.net/publication/274899216_EVALUACION_DE_UN_MATERIAL_LIGNOCELULOSICO_PARA_LA_PRODUCCION_DE_CELULASAS_XILANASAS_Y_LACASAS_POR_BASIDIOMICETOS_DEL_NORESTE_DE_MEXICO)

Universidad Estatal a Distancia. (2015). Situación de la palma aceitera se discutió en la región Brunca. <https://www.uned.ac.cr/acontecer/a-diario/educacion/2488-situaciondela-palma-aceitera-se-discutio-en-la-region-brunca>

Valderrama, A. (2013). *Biodegradación de residuos sólidos agropecuarios y uso del bioabono para acondicionar el suelo*. [Tesis de grado, Universidad Pontificia Boliviana]. <https://repository.upb.edu.co/handle/20.500.11912/1326>

- Valdés, S. (2018). *Aislamiento y purificación de enzimas microbianas de tipo lacasa, para la degradación de desechos de piña, banano y caña* [Tesis de grado, Universidad Nacional]. <https://repositorio.una.ac.cr/handle/11056/14365>
- Van Dam, J. (2016). Subproductos de la palma de aceite como materias primas de biomasa. *Palmas*, 37, 149-156. [https://web.fedepalma.org/conferenciainternacional/wp-content/uploads/2022/09/M\\_2\\_15\\_-Subproductos-de-la-palma.pdf](https://web.fedepalma.org/conferenciainternacional/wp-content/uploads/2022/09/M_2_15_-Subproductos-de-la-palma.pdf)
- Velasco, I., Cruz, C., Ángel, C., Medina, L., y Ramos, M. (2019). Control of Haematobia irritants and Stomoxys calcitrans with Metarhizium anisopliae in naturally infested cattle. *Revista MVZ Córdoba*, 24(1), 7091-7096. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0122-02682019000107091](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-02682019000107091)
- Venegas, C., Salazar, A., y Montero, C. (2013). *Balance energético de una extractora de aceite de palma aceitera, y análisis Técnico y económico para el uso más eficiente de la biomasa generada en el proceso de extracción*. [Tesis de grado, Universidad de Costa Rica] <http://repositorio.sibdi.ucr.ac.cr:8080/jspui/bitstream/123456789/1857/1/35431.pdf>

## 10. ANEXOS

### ANEXOS 1. Selenito de Sodio

Para su preparación se mezcló 5g de selenito de sodio en ml de agua destilada.

### ANEXOS 2. Sulfato de cobre

Se debió de disolver 5 g de sulfato de cobre pentahidratado en 50 mL de agua destilada.

### ANEXOS 3. Ácido bórico 4%

Se pesó 80 g de ácido bórico y se disolvió en 500 mL de agua destilada mientras se calentaba, una vez disuelto se retiró del calor y se dejó enfriar para ser llevado a un volumen de 2000 ml.

### ANEXOS 4. Indicador Shiro Tashiro

Se Disolvió 0,125 g rojo de metilo y 0,08 g de azul de metileno, en 100 ml de alcohol etílico.

### ANEXOS 5. Ácido sulfúrico 0,0200 N

Se tomó 2,2 mL de ácido Sulfúrico concentrado y se agregó 4 000 mL de agua destilada, después de realizado esto se tituló con NaOH 0,01000 para verificar la concentración.