



UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**Elaboración de un biofiltro a partir de micelio del hongo *Pleurotus ostreatus*  
sobre una matriz de sustrato orgánico y su eficiencia en la remoción de  
Arsénico presente en agua.**

Tesis para optar por el grado de Licenciatura en Biología con énfasis en Botánica.

Cristofer Coto-López

B42139

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

2023

## Tribunal Examinador

Dra. Melissa Mardones Hidalgo  
**Directora de Trabajo Final de Graduación**  
**Escuela de Biología**



---

Dr. Carlos Rojas Alvarado  
**Lector de Trabajo Final de Graduación**  
**Escuela de Ingeniería de Biosistemas**



---

Dr. Ronald Aguilar Álvarez  
**Lector de Trabajo Final de Graduación**  
**Escuela de Ingeniería de Biosistemas**



---

Dra. Cindy Fernández García  
**Presidenta del Tribunal Examinador**  
**Escuela de Biología**



---

Dra. Laura Solís Ramos  
**Miembro del Tribunal Examinador**  
**Escuela de Biología**



---

B.Sc. Cristófer Coto López  
**Sustentante**  
**Escuela de Biología**



---

## **Dedicatoria**

A Grace Hernández Araya (16/06/1935 – 29/04/2023)

Tita Grace ejemplo de persona, esposa, madre y abuela. Que siempre inundó cada espacio de amor y alegría. Que dejó una huella imborrable de gran amor por su familia. Siempre la recordaré y agradeceré a la vida por todo el amor, cariño, alegrías y chineos que me brindó. Siempre agradeceré la familia que junto a tito Roberto (Chachá), su amado esposo por 63 años, formaron con amor. Un abrazo al infinito y en paz descanses.

## **Agradecimientos**

Primero, agradecer a mi familia que ha sido, y es, el pilar de la persona y profesional que soy hoy en día. Mi mamá Lissette López y mi papá Javier Coto que me han enseñado a siempre dar el mayor esfuerzo posible en todo, me educaron con amor, cariño y comprensión. Ambos son un ejemplo por seguir y perseverar por alcanzar los objetivos. Mi mamá desde pequeño siempre presente, preocupada porque me educara, pero con comprensión y amor. Mi papá, ejemplo de trabajo duro y sacrificio. Estas enseñanzas de ambos son invaluable. A mi hermano Javier, gracias por estar siempre presente y ayudarme cada vez que lo ocupo; porque somos muy diferentes en personalidad, pero no en amor, le deseo lo mejor de la vida y compartir siempre juntos como familia.

En el arduo camino de este trabajo e investigación se encuentran personas muy importantes que dieron ánimos y ayuda. A mi novia María José que fue un pilar dándome ánimos cuando yo flaqueaba porque no obtenía lo esperado; además, me regaló otra gran familia. Deseo verte siendo feliz en lo que hagas en la vida. Así también en este camino agradecer a los amigos que de una u otra manera estuvieron pendientes y dando ánimos para poder lograrlo.

Agradecer al comité asesor por toda la ayuda brindada para poder darle rumbo a este trabajo. A Ronald Aguilar por la guía y conversaciones sobre filtros. Carlos Rojas que me dio guía y consejos durante la investigación. A Melissa Mardones, gracias por querer participar de esta idea, por siempre ayudar y pensar en maneras de lograr los objetivos; pero también gracias por no solo ser una directora desde lo académico si no también acompañando en lo emocional, que muchas veces se olvida que somos personas y no solo estudiantes.

Agradecer a REFORESTA del INII de la UCR por brindar insumos y materiales. De esta unidad agradezco la ayuda y enseñanza de Pedro Rojas. También a Karina Rodríguez y su asistente Jose Armando. Otro ente importante fue el CICA que realizó un financiamiento parcial. A la escuela de Biología, entre estos a todas las personas en proveeduría que me ayudaron en todo momento que ocupé su ayuda; a Karla, Mauricio y Dennis. A la dirección de la escuela que me ayudaron con trámites e insumos que ocupé durante el proceso. Gracias a todas las personas que de alguna u otra manera aportaron un granito de arena en el camino para que esta idea se pudiese concretar, y que espero sea un aporte y motivación para que otras personas sigan ideas similares.

## Resumen

Los hongos filamentosos se conforman por micelio, compuesto por un conjunto de hifas, de células alargadas con pared celular principalmente de quitina y proteínas, constituyéndolo en un material fibroso polimérico. Siendo usados en ocasiones como intercambiador de cationes o aniones, o como biopolímeros. Además, permitiendo crear biomateriales combinando micelio con un sustrato. Los hongos se han utilizado en biorremediación, adsorbiendo o degradando compuestos o elementos contaminantes en el ambiente. *Pleurotus ostreatus* es una de las especies más investigadas para la formación de materiales y biorremediación, ya que crece en una gran variedad de sustratos, en un rango amplio de temperatura y con un rápido crecimiento. En este estudio, se utilizó *P. ostreatus* junto con heno (*Digitaria eriantha*) para crear un material llamado biofiltro, siendo analizado en un proceso de biosorción de arsénico (As) en agua, con un sistema tipo batch con flujo lento. Además, se analizó condiciones para el crecimiento de *P. ostreatus*, así como características físicas e hidráulicas del biofiltro. Realizando dos tratamientos de diferente masa y tamaño. Se observó un rápido crecimiento del micelio similar en ambos tratamientos, donde en cinco días el micelio no denso cubrió casi la totalidad del sustrato y un tiempo final de crecimiento entre 30-32 días. Para ambos la densidad cualitativa del micelio fue la deseada con un micelio blanco y muy denso. Presentando dos tipos de micelio uno tipo “piel” y rígido, y otro algodonoso, dependiendo del contacto con superficies. Posteriormente, se secó el biofiltro en un horno a 60 °C y se observó un alto porcentaje de cambio de forma. Con una baja densidad aparente del biofiltro y alta una porosidad, siendo inversamente proporcional. Con esto presentando un alto porcentaje de absorción de agua, con diferencias entre tratamientos, probablemente por la cantidad de masa. Esto lo hizo deseable para procesos de biosorción. Aunque no se pudo comprobar la biosorción de As debido a que el heno poseía una concentración de As mucho mayor a la concentración inicial en el agua (10 µg/L), pero se observó un intercambio de iones de As entre el biofiltro y el agua. Con la creación del biofiltro se logró estandarizar un protocolo para la creación de un biomaterial o biofiltro con *P. ostreatus* en el país, y se consideró factible para su uso en procesos de biosorción, aunque con la necesidad de controlar previamente factores que afectaron al proceso de biosorción.

## INDICE GENERAL

Agradecimientos	1
Resumen	2
Lista de figuras	5
Lista de tablas	8
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
<b>1.1 El micelio fúngico</b>	9
<b>1.2 Biomateriales de micelio fúngico</b>	10
<b>1.3 Biofiltración y micorremediación</b>	11
<b>1.4 La biosorción</b>	12
<b>1.5 El hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> y sus características</b>	14
<b>1.6 Sustratos para el crecimiento de <i>Pleurotus</i></b>	15
<b>1.7 El heno o paca transvala de <i>Digitaria eriantha</i> como sustrato</b>	16
<b>1.8 Uso de pastos en remoción y el Arsénico en el ambiente</b>	17
<b>2. ANTEDECENTES</b>	
<b>2.1 Factores importantes para la formación de los biomateriales.</b>	18
<b>2.2 Proceso y condiciones para realizar biomateriales</b>	18
<b>2.3 Características importantes en los biomateriales</b>	20
<b>2.4 Materiales, sustratos y hongos en biosorción.</b>	21
<b>2.5 Procesos para realizar la biosorción.</b>	22
<b>2.6 Factores dentro del proceso de biosorción</b>	23
<b>2.7 Parámetros y métodos para remoción de arsénico</b>	24
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	25
<b>4. HIPÓTESIS DE TRABAJO</b>	26
<b>5. OBJETIVO</b>	
<b>5.1 Objetivo general</b>	26
<b>5.2 Objetivos específicos</b>	26

<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
<b>6.1 Producción de inóculo primario de <i>P. ostreatus</i></b>	<b>27</b>
<b>6.2 Preparación del sustrato de heno</b>	<b>28</b>
<b>6.3 Cinética de crecimiento de <i>P. ostreatus</i> en molde y elaboración del biofiltro</b>	<b>30</b>
<b>6.4 Mediciones de las características físicas e hidráulicas del Biofiltro</b>	
<b>6.4.1 Caracterización del crecimiento del micelio durante la formación del Biofiltro</b>	<b>32</b>
<b>6.4.2 Medición de características físicas e hidráulicas del Biofiltro</b>	<b>34</b>
<b>6.5 Sistema de biofiltración para la biosorción de arsénico en agua con el biofiltro</b>	
<b>6.5.1 Construcción del sistema de biofiltración</b>	<b>36</b>
<b>6.5.2 Preparación del agua con arsénico</b>	<b>38</b>
<b>6.5.3 Parámetros de funcionamiento del SB</b>	<b>38</b>
<b>6.6 Análisis estadístico</b>	<b>38</b>
<b>7. RESULTADOS</b>	
<b>7.1 Descripción visual del biofiltro de <i>P. ostreatus</i> sobre heno</b>	<b>39</b>
<b>7.2 Crecimiento del micelio de <i>P. ostreatus</i></b>	<b>41</b>
<b>7.3 Características físicas e hidráulicas del biofiltro</b>	<b>44</b>
<b>7.4 Parámetros analizados del agua con As y el biofiltro durante el funcionamiento en el sistema de biosorción</b>	<b>49</b>
<b>8. DISCUSIÓN</b>	
<b>8.1 Crecimiento del micelio de <i>P. ostreatus</i> en la creación del biofiltro y los dos tratamientos utilizados</b>	<b>50</b>
<b>8.2 Características físicas e hidráulicas del biofiltro</b>	<b>51</b>
<b>8.3 Parámetros analizados del agua con As y el biofiltro durante el funcionamiento en el sistema de biosorción</b>	<b>55</b>
<b>9. CONCLUSIÓN</b>	<b>57</b>
<b>10. RECOMENDACIONES</b>	<b>60</b>
<b>11. REFERENCIAS</b>	<b>62</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Procedimiento de preparación del inoculo primario de *Pleurotus ostreatus* usando como sustrato arroz blanco comercial. Fase I: preparación y esterilizado del arroz, Fase II: inoculado del arroz mediante cuadros de cultivo PDA con micelio de *P. ostreatus*, Fase III: Incubación y resultado final de la semilla. 28
- Figura 2.** Preparación del sustrato de heno *Digitaria eriantha* (A: secado en horno, B: particionado, C: tamizado, D: lavado, E: empacado del heno y F: autoclavado). 30
- Figura 3.** Elaboración de biofiltro con micelio de *Pleurotus ostreatus* y heno (*Digitaria eriantha*) en molde plástico de 7L. A: se observa el sustrato y hasta dónde llega, este caso para 5cm de altura, B: semilla o inóculo de *P. ostreatus* en relación 30% peso/peso, C: adición y mezcla de la semilla con el sustrato y D: sellado con filme plástico con agujeros para la incubación. 32
- Figura 4.** Fotografías tomadas de la cara superior e inferior del biofiltro con micelio de *Pleurotus ostreatus* y heno (*Digitaria eriantha*). Se utilizaron para ser analizadas mediante el software ImageJ 1.8.0\_112 para calcular el área abarcada por el micelio. Estas fotografías muestran el segundo día de observación. 33
- Figura 5.** Densidad cualitativa del micelio de *Pleurotus ostreatus* creciendo sobre heno (*Digitaria eriantha*) formando el biofiltro. Mostrando la progresión desde la densidad uno (i) a la densidad cinco (v). Para cada densidad se muestra del lado izquierdo la vista de la cara superior y del lado derecho la vista de la cara inferior. 34
- Figura 6.** Mediciones realizadas del largo, ancho y altura para determinar el volumen seco del biofiltro de micelio de *Pleurotus ostreatus* creciendo sobre heno (*Digitaria eriantha*). Cada flecha indica una medición realizada; para la altura se realizaron tres mediciones en el largo y tres mediciones en el ancho,

en los lugares que indican las flechas, promediando estas mediciones para obtener la altura.

36

**Figura 7.** Sistema de biofiltración (SB) de agua donde se colocó el biofiltro del micelio de *Pleurotus ostreatus* creciendo sobre heno (*Digitaria eriantha*). A: recipiente superior de 24L donde se introdujo y se selló el recipiente más pequeño de 7L y con agujero, B: recipiente pequeño de 7L unido al recipiente plástico superior, se observa la malla plástica sellada al recipiente, C: interior del sistema observándose por un lateral la bomba sumergible (color negro) en el recipiente inferior de 24L y pasando la manguera al recipiente superior de 24L y D: se observa el biofiltro sellado dentro del sistema y la manguera que mueve el agua.

37

**Figura 8.** Textura del micelio de *Pleurotus ostreatus* en el último día de crecimiento del biofiltro, antes del secado en el horno (micelio vivo) y posterior al secado en el horno (micelio seco) durante 24 horas a 60 °C. Las imágenes de la parte superior corresponden a la cara superior del biofiltro y las inferiores a la cara inferior del biofiltro.

40

**Figura 9.** Curva de crecimiento del micelio de *Pleurotus ostreatus* sobre el heno (*Digitaria eriantha*) en un período de 34 días, para un total de 16 mediciones en lapsos de dos o tres días. A: Tratamiento 1 (T1, peso húmedo 260g), B: Tratamiento 2 (T2, peso húmedo 455g).

41

**Figura 10.** Tasa de crecimiento (% / Día) del micelio de *Pleurotus ostreatus* durante los 34 días de crecimiento para Tratamiento 1 (T1, peso húmedo 260g) y Tratamiento 2 (T2, peso húmedo 455g). El punto rojo muestra la media para cada tratamiento.

42

**Figura 11.** Cambio en la densidad cualitativa del micelio de *Pleurotus Ostreatus* durante 34 días de crecimiento sobre heno (*Digitaria eriantha*), para un total de 16 mediciones en lapsos de dos o tres días. Tratamiento 1 (T1, peso húmedo 260g) y Tratamiento 2 (T2, peso húmedo 455g).

43

**Figura 12.** Tiempo final (días) de crecimiento del micelio de *Pleurotus ostreatus* sobre el heno (*Digitaria eriantha*), para Tratamiento 1 (T1, peso húmedo 260g) y Tratamiento 2 (T2, peso húmedo 455g). El punto rojo muestra la media para cada tratamiento. 43

**Figura 13.** Porcentaje del cambio de forma, en volumen, del biofiltro después del secado en horno a 60°C por 24 horas, para Tratamiento 1 (T1, peso húmedo 260g) y Tratamiento 2 (T2, peso húmedo 455g). El punto rojo muestra la media para cada tratamiento. 44

**Figura 14.** Densidad aparente ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ) del biofiltro posterior al secado en horno a 60°C por 24 horas, para Tratamiento 1 (T1, peso húmedo 260g) y Tratamiento 2 (T2, peso húmedo 455g). El punto rojo muestra la media para cada tratamiento. 45

**Figura 15.** Porosidad aparente (%) del biofiltro a partir de los pesos del material (el peso húmedo, el peso seco y el peso saturado medido en la prueba de absorción de agua), para Tratamiento 1 (T1, peso húmedo 260g) y Tratamiento 2 (T2, peso húmedo 455g). El punto rojo muestra la media para cada tratamiento. 45

**Figura 16.** Curva del porcentaje de absorción de agua por parte del biofiltro seco hasta estabilizar el peso a las 6.5 horas, para un total de 14 mediciones en lapsos de cada media hora. Tratamiento 1 (T1, peso húmedo 260g) y Tratamiento 2 (T2, peso húmedo 455g). 46

**Figura 17.** Porcentaje final de absorción de agua del biofiltro al finalizar las 6.5 horas de mantenerse sumergido. Para Tratamiento 1 (T1, peso húmedo 260g) y Tratamiento 2 (T2, peso húmedo 455g). El punto rojo muestra la media para cada tratamiento. 47

**Figura 18.** Tasa de absorción de agua por hora ( $\text{mL}/\text{h}$ ) del biofiltro durante las 6.5 horas, para Tratamiento 1 (T1, peso húmedo 260g) y Tratamiento 2 (T2, peso húmedo 455g). El punto rojo muestra la media para cada tratamiento. 48

**Figura 19.** Cantidad de agua absorbida por gramo (mL/g) de biofiltro al finalizar las 6.5 horas de sumergido, para Tratamiento 1 (T1, peso húmedo 260g) y Tratamiento 2 (T2, peso húmedo 455g). El punto rojo muestra la media para cada tratamiento.

48

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.** Parámetros medidos en el agua antes y después de iniciar el tratamiento de adsorción con el biofiltro de *Pleurotus ostreatus* sobre heno (*Digitaria eriantha*). Tratamiento 1 (T1, peso húmedo 260g) y Tratamiento 2 (T2, peso húmedo 455g). (Para concentración final y eficiencia de biosorción se muestra la mediana del tratamiento).

49

**Tabla 2.** Concentración de As en el biofiltro después del funcionamiento en el sistema de biosorción y de una muestra de heno sin micelio del hongo, sin colocarse en el sistema. (Para la concentración en los biofiltros se muestra la mediana del tratamiento).

49

## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1. El micelio fúngico

Los hongos filamentosos forman células elongadas, llamadas hifas, que en conjunto forman el micelio, el cual puede ramificarse formando redes complejas en el sustrato sobre el que van creciendo y descomponiendo (Boddy & Hiscox, 2016; Haneef et al., 2017). Esta característica le permite a los hongos acumular gran cantidad de biomasa en un corto periodo de tiempo (Feofilova, 2010). La forma y patrón de crecimiento del micelio depende de la especie de hongo y de factores ambientales como tipo de sustrato, organismos antagonistas y nutrientes del sustrato (Boddy & Hiscox, 2016). El micelio penetra en el sustrato por medio de presión física, la excreción de enzimas que degradan el sustrato y crecimiento apical del micelio, el cual puede moverse a nuevas fuentes de nutrientes e interconectar fuentes viejas con nuevas (Boddy & Hiscox, 2016; Feofilova, 2010; Haneef et al., 2017).

El micelio de la mayoría de hongos está compuesto de quitina y proteínas que lo constituyen en un material fibroso polimérico (Haneef et al., 2017). La pared celular está compuesta en su mayoría por polisacáridos (Latgé, 2007). De estos, los glucanos y la quitina conforman la estructura central de la pared celular (Feofilova, 2010; Gow et al., 2017; Latgé, 2007). Específicamente, se forma un complejo entre el  $\beta(1-3)$ - $\beta(1-6)$  glucanos unido a la quitina por un enlace con  $\beta(1-4)$  glucano (celulosa) (Feofilova, 2010; Gow et al., 2017; Latgé, 2007). La cantidad de genes de expresión para quitina y glucano sintetasas varía de acuerdo a la especie de hongo, pero la síntesis de quitina puede aumentar en respuesta a un estrés en la pared celular (Latgé, 2007). Por lo que, parte de sus funciones deriva en la protección (Feofilova, 2010). Además, la relación entre quitina y glucano varía a lo largo de la ontogenia del micelio y depende de factores ambientales (Feofilova, 2010).

Aparte de estos componentes estructurales, se pueden encontrar otros como manoproteínas y aminoácidos como xilosa, manosa y glucosa, este último presente en mayor cantidad (Feofilova, 2010). Además, proteínas GPI, transglicosidasas, yapsinas, adhesinas e hidrofobinas, todos estos llamados componentes intraestructurales (Gow et al., 2017). Las yapsinas, por ejemplo, son importantes dentro del mantenimiento estructural de la pared (Gow et al., 2017). Y dentro de los esteroides, el que se encuentra en mayoría es el ergosterol (Walker & White, 2017). En general la estructura central de la pared de los hongos no posee tanta

variabilidad, pero los componentes intraestructurales unidos a esta sí poseen gran variabilidad y son especializados a grupos o especies de hongos (Gow et al., 2017; Latgé, 2007). Esta composición y variabilidad permite que se pueda utilizar como biopolímeros; también, como intercambiador de cationes o aniones, capacidad que va a depender de factores ambientales y la composición de la pared (Feofilova, 2010).

Los hongos requieren de sustratos fuentes de nutrientes que son necesarios para su crecimiento como carbono, oxígeno, sulfuro, fósforo, potasio, magnesio y nitrógeno (Walker & White, 2017). No pueden fijar nitrógeno por lo que requieren fuentes con este elemento, en donde se ha observado que influye en gran parte en el crecimiento y densidad del micelio (Boyle, 1998; Hoa & Wang, 2015; G. M. Walker & White, 2017). Para obtener estos nutrientes emplean diversas enzimas las cuales varían de acuerdo al grupo de hongos y su capacidad para degradar diferentes compuestos (Tuor et al., 1995; G. M. Walker & White, 2017)..

## **1.2. Biomateriales de micelio fúngico**

Las características de los hongos hacen que sean importantes y favorables desde el punto de vista de aplicaciones humanas. Por ejemplo, se pueden realizar materiales, o llamados biomateriales, a partir del crecimiento del micelio en combinación con un sustrato orgánico o inorgánico, donde se le provea al hongo de los nutrientes necesarios (Haneef et al., 2017; Appels et al., 2019; Elsacker, Vandeloock, Brancart, Peeters, & De Laet, 2019). Los materiales formados por micelio utilizan partículas de un sustrato, las cuales son unidas por el micelio del hongo, siendo posible crear diversas formas o estructuras, dándoles forma a partir de un molde (Alemu et al., 2022; Angelova et al., 2021). Dentro del grupo de hongos que presenta mejores características para la formación de materiales se encuentran los basidiomicetes, y de este las especies más investigadas son *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm y *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. (Alemu et al., 2022; Angelova et al., 2021; Butu et al., 2020; Mohd et al., 2022; Sydor et al., 2022).

Los materiales con hongos presentan ventajas como un menor impacto ambiental, debido a que la mayoría utiliza materiales orgánicos como sustrato, que pueden ser productos locales o residuos que se revalorizan (Alemu et al., 2022; Sydor et al., 2022). El utilizar organismos vivos también presenta desafíos para poder estandarizar protocolos, y al realizar materiales se deben tomar en cuenta varios factores que afectan el producto final, por ejemplo, la especie que se

utilice, el sustrato, la temperatura, la humedad, el tiempo de incubación o si se le añade algún otro nutriente o material a la matriz (Alemu et al., 2022; Angelova et al., 2021; Ghazvinian & Gürsoy, 2022; Mohd et al., 2022; Sydor et al., 2022). Dentro de una misma especie o incluso cepa de hongo, las características del micelio van a ser influenciadas por el sustrato, esto debido a que las características nutricionales, físicas, de compactación o tamaño de partícula pueden determinar la rapidez de crecimiento, la cantidad de biomasa, la densidad del micelio o la composición enzimática (Alemu et al., 2022; Ghazvinian & Gürsoy, 2022; Nashiruddin et al., 2022; Sydor et al., 2022; Vašatko et al., 2022).

### **1.3. Biofiltración y micorremediación**

Algunos materiales se pueden considerar como biofiltros, los cuales han sido utilizados e investigados para procesos de biofiltración ya sea en medios líquidos o gaseosos (Garzón-Zúñiga et al., 2012). Son procesos por los cuales mediante medios orgánicos o materiales biológicos se adsorbe o degrada algún compuesto de interés (Cobos et al., 2009; Garzón-Zúñiga et al., 2012; Kirisits et al., 2019; Pachaiappan et al., 2022; Vicente Reyes, 2016). Se pueden emplear materiales como virutas de madera, diferentes tipos de piedras o gravas (Bruneel et al., 2020; Cobos et al., 2009; Garzón-Zúñiga et al., 2012; Ghasemi et al., 2020). Estos biofiltros usan microorganismos, como hongos, bacterias u organismos más grandes como plantas, para adsorber o degradar (Bruneel et al., 2020; Ghasemi et al., 2020; Pachaiappan et al., 2022). El uso de hongos en métodos de biofiltración se conoce como micofiltración (Mehta et al., 2017).

Los biofiltros con hongos se pueden realizar combinando materiales vegetales y micelio fúngico, o aprovechando como sustratos los subproductos del cultivo de hongos comestibles (García-Delgado et al., 2017; Mehta et al., 2017). Para la adsorción de contaminantes en agua se han usado pellets de micelio o material a partir del hongo seco (biomasa muerta), ya sea sin soporte o inmovilizado en un soporte, como ejemplo el alginato (Hanif et al., 2015; L. Li et al., 2020; Rozman et al., 2020). La micorremediación suele utilizar estos materiales para realizar procesos como bioconversión, biodegradación o biosorción (Ayele et al., 2021; Malik et al., 2021; Yadav et al., 2021). Dentro de los procesos de biorremediación, el uso del micelio presenta varias ventajas como el bajo costo, que es amigable con el ambiente y no es invasivo; por esto y la eficiencia al biorremediar, es que se presenta como una de las técnicas más efectivas (Barh et al., 2019; Thakur, 2019). Uno de los desafíos o punto clave de la micorremediación es

encontrar la especie, el tratamiento y las condiciones más favorables para el o los contaminantes a eliminar; por lo que se presenta como posible desventaja que al ser un sistema biológico la efectividad no llegue al 100% (Ayele et al., 2021; Malik et al., 2021).

Dentro de los procesos de biorremediación, más en específico en la micorremediación, se pueden encontrar la biodegradación, la bioconversión y la biosorción (Barh et al., 2019; Malik et al., 2021; Raman et al., 2021; Thakur, 2019; Yadav et al., 2021). La biodegradación se refiere a convertir sustancias o compuestos orgánicos complejos mineralizándolos en formas más simples y las cuales no son tóxicas en el ambiente (Barh et al., 2019; Kulshreshtha et al., 2014; Malik et al., 2021; Thakur, 2019; Yadav et al., 2021). Este proceso se da por medio de las enzimas extracelulares que secretan los hongos, las cuales poseen radicales libres y no son específicas a un compuesto, si no, que pueden romper enlaces ester, eter, amida, cadenas alifáticas o anillos aromáticos (Kulshreshtha et al., 2014; Thakur, 2019; Yadav et al., 2021). Aprovechándose esta característica para degradar compuestos como tintes sintéticos, hidrocarburos policíclicos aromáticos, pentaclorofenol, plásticos o explosivos (Kulshreshtha et al., 2014; Malik et al., 2021; Raman et al., 2021).

#### **1.4. La biosorción**

La biosorción se refiere al proceso de absorber o remover contaminantes presentes en aire, suelo o agua mediante la utilización de biomasa viva o muerta (Barh et al., 2019; Kulshreshtha et al., 2014; Malik et al., 2021; Pachaiappan et al., 2022; Thakur, 2019; Yadav et al., 2021). Este proceso puede depender del metabolismo del hongo, en este caso necesitando que el hongo esté vivo, o puede ser independiente del metabolismo, donde se puede utilizar el hongo u organismo vivo pero también puede ser muerto o biomasa seca (Barh et al., 2019; Kulshreshtha et al., 2014; Yadav et al., 2021). Se pueden tener varias fases en el proceso, donde primeramente el material realiza una rápida adsorción en su superficie, luego cambia a ser una adsorción interna más lenta para finalmente alcanzar un equilibrio (Yadav et al., 2021). Sin embargo, la rapidez y eficiencia de adsorción puede verse influenciada por varios factores como el pH del medio, la temperatura, la cantidad de biomasa, la naturaleza del material, la composición de la pared celular, el tiempo de contacto, la agitación o flujo del medio y la concentración inicial del contaminante (Ayele et al., 2021; Kulshreshtha et al., 2014; V. Kumar & Dwivedi, 2021; Pachaiappan et al., 2022; Rangabhashiyam et al., 2014; Yadav et al., 2021).

De los factores que afectan el proceso de biosorción, el pH es uno de los más importantes, especialmente cuando se utiliza biomasa muerta o seca (Joseph et al., 2019; V. Kumar & Dwivedi, 2021). Debido a que el pH puede afectar la solubilidad del contaminante y puede incrementar los sitios libres o activos para que el contaminante se una a la biomasa (Ayele et al., 2021; V. Kumar & Dwivedi, 2021). La temperatura puede influenciar el proceso de adsorción ya que una alta temperatura puede afectar los sitios activos; dañando los sitios o porque sucede un proceso de desorción, oscilando la temperatura óptima entre 20-30°C (Ayele et al., 2021; V. Kumar & Dwivedi, 2021). La concentración inicial del contaminante afecta a la tasa de adsorción, donde se ha visto que concentraciones altas aumentan la tasa pero se satura rápido, mientras que concentraciones bajas causan que la tasa sea lenta hasta alcanzar un equilibrio (Ayele et al., 2021; Kulshreshtha, 2019; V. Kumar & Dwivedi, 2021). Además de estos factores, es importante conocer e investigar la naturaleza del material, cuál o cuáles organismos utiliza, ya que esto también influye en el proceso (Kulshreshtha et al., 2014; Pachaiappan et al., 2022; Yadav et al., 2021).

Entonces, un factor clave en el proceso de biosorción es seleccionar el organismo o material más apto para un determinado contaminante, tomando en cuenta que la capacidad de adsorción depende de las características del material, organismo o especie (Kulshreshtha, 2019; Kulshreshtha et al., 2014; Pachaiappan et al., 2022). Idealmente, el material debe poseer una alta porosidad, ya que esto aumenta el área con sitios activos disponibles (Kulshreshtha, 2019; Kulshreshtha et al., 2014; Pachaiappan et al., 2022). La cantidad de biomasa que se utilice también influye en el proceso, donde generalmente, a mayor biomasa se obtiene mayor adsorción, ya que se aumenta la cantidad de área y sitios libres para interactuar con el contaminante (Ayele et al., 2021; V. Kumar & Dwivedi, 2021). El tiempo de contacto se refiere al tiempo que se expone el material junto con el contaminante, primero la adsorción ocurre de manera rápida y luego decrece pero continua adsorbiendo, donde el tiempo óptimo o la saturación del material depende de sus características (Ayele et al., 2021; Kulshreshtha, 2019; V. Kumar & Dwivedi, 2021).

Los hongos han demostrado una alta efectividad en procesos de biosorción o biorremediación, pudiendo remover gran variedad de contaminantes, especialmente en biorremediación de metales (Kapahi & Sachdeva, 2017; V. Kumar & Dwivedi, 2021; Raman et

al., 2021; Rangabhashiyam et al., 2014; Yadav et al., 2021). Se ha utilizado tanto biomasa viva como muerta, la viva con mejores características para biodegradación, pero requiriendo mayor mantenimiento; mientras la biomasa muerta puede poseer mejores características para la biosorción (Kulshreshtha, 2019; Kulshreshtha et al., 2014; V. Kumar & Dwivedi, 2021). La biomasa muerta se ve menos influenciada por otras variables y a ambas se le pueden realizar tratamientos químicos o físicos para mejorar la adsorción (Kapahi & Sachdeva, 2017; V. Kumar & Dwivedi, 2021). Por ejemplo, a los materiales de biomasa seca o muerta se le aplica calor, y en algunas ocasiones esto podría ayudar a exponer sitios activos para la adsorción (V. Kumar & Dwivedi, 2021). Para la formación y utilización de estos materiales se han investigado y observado mejores características en los hongos filamentosos, principalmente basidiomicetes de pudrición blanca de la madera (Noman et al., 2019; Thakur, 2019; Yadav et al., 2021); dentro de este grupo se encuentra *P. ostreatus*, el cual ha sido ampliamente investigado en muchas aplicaciones (Kulshreshtha, 2019; Osarenotor et al., 2021; Rangabhashiyam et al., 2014; Thakur, 2019; Yadav et al., 2021).

### **1.5. El hongo *Pleurotus ostreatus* y sus características.**

*Pleurotus ostreatus* es un hongo basidiomicete de la pudrición blanca, el cual por medio de un sistema de enzimas lignocelulolíticas es capaz de degradar lignina, celulosa y hemicelulosa (Chang et al., 2018; Palin et al., 2016; Vaverková et al., 2018). Dentro de las enzimas más importantes se pueden nombrar las lacasas y peroxidasas para degradar lignina, las celulasas y endoglucanasas para degradar celulosa y las xilanasas que degradan hemicelulosa (Álvarez-Cervantes et al., 2016; Elisashvili et al., 2008; Fernández-Fueyo et al., 2016; Luz et al., 2012; Salmones et al., 2005; Valášková & Baldrian, 2006). Entre las enzimas que degradan la lignina, el componente más difícil de degradar, se encuentran varias lacasas, manganeso peroxidasas y peroxidasas versátiles; todas pueden participar sucesivamente o en conjunto (Fernández-Fueyo et al., 2016; Valášková & Baldrian, 2006). Generalmente, cuando *P. ostreatus* se encuentra en un sustrato que contiene lignina, el hongo degrada primero la lignina y luego los polisacáridos, pero esto es dependiente del tipo de sustrato (Álvarez-Cervantes et al., 2016; Bánfi et al., 2015; Elisashvili et al., 2008; Fernández-Fueyo et al., 2016; Luz et al., 2012; Salmones et al., 2005).

La expresión y la cantidad de enzimas que produce *P. ostreatus* es afectada por factores como la composición del sustrato, el pH del medio, la disponibilidad de oxígeno, la temperatura, la relación carbono/nitrógeno y la variabilidad genética de cada cepa del hongo (Álvarez-Cervantes et al., 2016; Luz et al., 2012). Sin embargo, algunos tipos de formas de enzimas serían constitutivas y otras inducidas, donde principalmente las lacasas y su expresión dependen del tipo de sustrato tanto en composición como el tamaño de partícula (Álvarez-Cervantes et al., 2016; Fernández-Fueyo et al., 2016; Melanouri et al., 2022; Membrillo et al., 2008). La expresión de estas enzimas varía a través del tiempo cuando degradan el sustrato; la actividad o expresión de las lacasas y peroxidases es mayor durante la fase vegetativa, cuando el micelio va creciendo y colonizando el sustrato, pero cuando el hongo va a fructificar, éstas enzimas bajan su actividad y es cuando aumentan las celulasas y xilanasas (Bánfi et al., 2015; Elisashvili et al., 2008; Luz et al., 2012). Este cambio en actividad se podría deber a la necesidad de formar el cuerpo fructífero donde se ocupa bastante energía (Luz et al., 2012).

Además de esta expresión enzimática, un factor que determina el crecimiento de *P. ostreatus* es la temperatura, ya que puede influir en la expresión de enzimas, en la composición de la pared celular y en el crecimiento general (Bugarski et al., 2002; Fletcher et al., 2019; Yan et al., 2020; Zharare et al., 2010). El rango de temperaturas para el crecimiento óptimo de *P. ostreatus* oscila entre los 22-30 °C, donde a 35 °C o más genera cambios a nivel enzimático, de pH o de constitución celular, provocando el descenso en el crecimiento o la muerte (Bugarski et al., 2002; Fletcher et al., 2019; Yan et al., 2020; Zharare et al., 2010). Los diferentes factores de estrés ambiental generan cambios en el hongo, por ejemplo, a nivel de la pared celular muchas veces el hongo genera más quitina, o a nivel metabólico genera más compuestos como aminoácidos o polifenoles que le confieren resistencia o defensa a estos cambios (Pérez et al., 2021; Yan et al., 2020).

### **1.6. Sustratos para el crecimiento de *Pleurotus*.**

La composición del sustrato o el tipo de sustrato que se utiliza para el crecimiento de *P. ostreatus* es importante, debido a que las características del micelio pueden variar en una misma cepa (Fletcher et al., 2019; Gou et al., 2021; Krupodorova et al., 2021; Membrillo et al., 2008, 2011). Una ventaja del hongo es que puede crecer en muchos sustratos, por ejemplo, se puede cultivar en medios como PDA, MEA u otros que contengan algún tipo de azúcar (Fletcher et

al., 2019; Krupodorova et al., 2021; Zharare et al., 2010). Cuando se realiza el cultivo o la formación de un biomaterial utilizando *Pleurotus* se han investigado gran diversidad de sustratos que pueden variar algunos aspectos sobre el crecimiento; usando combinación de varios sustratos, combinando con algún nutriente o material inerte o utilizando solo un sustrato (Angelova et al., 2021; Melanouri et al., 2022; Mohd et al., 2022; Sydor et al., 2022). *Pleurotus* puede crecer en bambú (Gan et al., 2022), residuos de algodón (Gou et al., 2021; Melanouri et al., 2022), residuos de café (Luz et al., 2012; Melanouri et al., 2022; Salmones et al., 2005), salvado de trigo (Gou et al., 2021; Melanouri et al., 2022), diferentes tipos de aserrín o astillas de maderas (Fernández-Fueyo et al., 2016; Ghazvinian et al., 2019; Luz et al., 2012; Melanouri et al., 2022; Sherief et al., 2010) y diferentes tipos de paja, heno o pasto seco, que es uno de los sustratos más investigados y utilizados a nivel comercial (Bánfi et al., 2015; Elisashvili et al., 2008; Fernández-Fueyo et al., 2016; Ghazvinian et al., 2019; Melanouri et al., 2022; Sainos et al., 2006; Salmones et al., 2005; Sherief et al., 2010; Valášková & Baldrian, 2006).

### **1.7. El heno o paca transvala de *Digitaria eriantha* como sustrato.**

Uno de los pastos utilizados para realizar heno, y el cual también ha sido ampliamente utilizado en cultivo comercial de *P. ostreatus*, es *Digitaria eriantha* Steud. y todas sus variedades (Gregori et al., 2007; Hernández et al., 2003; Pitman et al., 2004; Vieira & de Andrade, 2016). *D. eriantha* es una especie nativa de Sudáfrica, la cual fue introducida ampliamente en todo América para su uso como forrajera (Pitman et al., 2004; Vega & Rúgolo, 2007). A nivel taxonómico hay mucha confusión en su nombre y mucho más en cuanto a nombres comunes; *D. decumbens* Stent y *D. pentzii* Stent entran dentro de *D. eriantha*, y dentro de todos estos existen gran cantidad de variedades con diferentes nombres comunes en cada región de cultivo (Pitman et al., 2004; Pozzobon et al., 2006; Vega & Rúgolo, 2007). Para Costa Rica se conocen variedades bajo los nombres de pangola y transvala, que se utilizan tanto para alimentación de animales en finca o para la fabricación de heno (Cerdas & Vallejos, 2012; Pitman et al., 2004; Vega & Rúgolo, 2007).

*Digitaria eriantha* se estableció como especie forrajera comercial debido a que se adapta a diversas condiciones, resiste diferentes niveles de pastoreo o corta y es palatable; además, tolera bien los ambientes subtropicales con condiciones de lluvia moderada, resiste ciertos niveles de salinidad y se puede encontrar aproximadamente de los 25-2300 m.s.n.m. (Brauer &

Wolfson, 1986; Cerdas & Vallejos, 2012; Osbourn, 1969; Pitman et al., 2004; Vega & Rógolo, 2007). Este pasto posee celulosa, hemicelulosa y lignina en sus paredes celulares, variando el porcentaje de estos componentes de acuerdo con la morfología de la planta, su ontogenia o ciertos factores abióticos (Ford, 1983; Gomide et al., 1969; Jack et al., 2020). Comparado con otros pastos comunes, posee un contenido de celulosa y hemicelulosa de medio a alto (Ford, 1983; Gomide et al., 1969). También, en cuanto a contenido de lignina, tiene un alto porcentaje, y este aumenta conforme avanza el tiempo de crecimiento (Ford, 1983; Gomide et al., 1969; Jack et al., 2020).

### **1.8. Uso de pastos en remoción y el Arsénico en el ambiente.**

Una característica de *D. eriantha*, aunque poco investigada, es la tolerancia y acumulación de metales, pudiendo crecer en suelos con concentraciones altas de Pb, Ni, Cr, Cu y V (Okedeyi et al., 2014; Panichev et al., 2006). Hay estudios que muestran que en la planta se encuentran estos metales, lo que indica que son adsorbidos por la planta, además también se observa que el crecimiento disminuye (Okedeyi et al., 2014; Panichev et al., 2006; Titshall et al., 2007). Particularmente en *D. eriantha*, no se conoce su uso como absorbente de arsénico (As), pero si se han usado diversos pastos similares, como trigo, para la adsorción de As mediante un material seco pirolizado (Amen et al., 2020).

El As se encuentra ampliamente distribuido por el mundo, este puede llegar al agua por procesos naturales o por procesos mediados por el ser humano (Ali et al., 2018; Sharma & Bhattacharya, 2017). De manera natural, las fuentes de agua pueden contener As debido a los depósitos naturales en la tierra, ya que este elemento se encuentra en 200 tipos de minerales, los cuales pueden ser liberados en el ambiente por procesos geológicos (Ali et al., 2018; D. B. Walker et al., 2019). Usualmente en el agua el As se encuentra de dos formas, como arsenito (As (III)) o arseniato (As(V)), siendo el As (III) el más tóxico (Ali et al., 2018; Walker et al., 2019). El consumo de agua contaminada con As puede generar problemas a la salud de los seres humanos, presentándose molestias a corto plazo y no duraderas, o problemas a más largo plazo como el cáncer en varios órganos del cuerpo (Sharma & Bhattacharya, 2017; Ali et al., 2018; Walker et al., 2019).

## **2. ANTEDECENTES.**

### **2.1. Factores importantes para la formación de los biomateriales.**

Los biomateriales realizados a partir de micelio fúngico han venido en auge y hay distintas especies o protocolos para la formación de estos biomateriales que se pueden aplicar en el campo médico, cosmético, de la construcción o de empaques (Manan et al., 2021). En su mayoría estos materiales han sido utilizados como sustitutos del poliestireno expandido, materiales para construcción o arquitectura y materiales aislantes de sonido, y se ha observado que pueden llegar a ser una opción viable, amigable con el ambiente y de no tan alto costo. (Attias et al., 2017; Elsacker et al., 2019; Joshi et al., 2020; Sivaprasad et al., 2021; Sydor et al., 2022; Vašatko et al., 2022).

A la hora de realizar un biomaterial a partir del micelio fúngico es importante tomar en cuenta que los procesos, materiales utilizados y factores ambientales pueden influir directamente en las características del material (Butu et al., 2020; Girometta et al., 2019). La densidad del biomaterial está determinada por la naturaleza del sustrato que se emplea, la manera de compactar el sustrato previo a la inoculación, el tamaño de partícula e incluso la disposición de cada partícula pueden influir en la densidad o rigidez del material (Rigobello & Ayres, 2022; Vašatko et al., 2022). La presencia de micropartículas y una compactación, después del crecimiento o formación del material, incrementan la densidad (Houette et al., 2022). La densidad del material puede determinar la capacidad de absorción de agua. Algunos resultados indican que en baja densidad se absorbe más agua, cuando una mayor colonización del sustrato resulta en una mayor porosidad y menor densidad (Attias et al., 2020; Lee & Choi, 2021). El peso final del material puede variar debido a la densidad, esto determinado por el tipo de sustrato y la variabilidad en el crecimiento del micelio (Lee & Choi, 2021). A nivel del micelio, el tipo o cantidad de nutriente influye en las características, donde, por ejemplo, en un medio con más lignina crece más rápido, aparenta mayor densidad y las fibras son más elongadas, mientras en un medio con glucosa es más compacto y poroso (Antinori et al., 2020).

### **2.2. Proceso y condiciones para realizar biomateriales.**

El proceso general para realizar un biomaterial comienza por seleccionar una especie de hongo, donde generalmente se desea que esta posea buen crecimiento, una buena densidad de

micelio y sea fácil de cultivar, lo que lleva a un bajo costo de producción y versatilidad en la nutrición, por lo que los hongos de la pudrición blanca son los mayormente recomendados (Alemu et al., 2022; Angelova et al., 2021; Sydor et al., 2022). Varios hongos de pudrición blanca han sido ampliamente utilizados, como *G. lucidum* (Antinori et al., 2020; Escaleira et al., 2020; Rigobello & Ayres, 2022; Vašatko et al., 2022) y varias especies de *Trametes* (Appels et al., 2019; Attias et al., 2020; Elsacker et al., 2019; Escaleira et al., 2020), pero la especie más utilizada sigue siendo *P. ostreatus* (Appels et al., 2019; Escaleira et al., 2020; Joshi et al., 2020; Lee & Choi, 2021; Nashiruddin et al., 2022; Sivaprasad et al., 2021; Vašatko et al., 2022). Generalmente, se realiza un inóculo del hongo en un medio de cultivo; para *P. ostreatus* este inóculo puede ser realizado en diversos medios o sustratos, siendo papa dextrosa agar (PDA) un medio idóneo para el crecimiento como inóculo (Fletcher et al., 2019). Este inóculo se combina con el sustrato, el cual previamente debe ser esterilizado para evitar contaminantes que afecten el crecimiento del hongo (Alemu et al., 2022; Angelova et al., 2021; Ghazvinian & Gürsoy, 2022; Girometta et al., 2019).

La cantidad de inóculo respecto al peso del sustrato (p/p) puede variar, se puede emplear desde el 3%-5%, 10-20% o hasta un 40% (Alemu et al., 2022; Attias et al., 2020; Nashiruddin et al., 2022; Vašatko et al., 2022). El óptimo de inóculo a utilizar varía dependiendo de otros factores, pero generalmente, al incrementar la cantidad de inóculo, incrementa la tasa de crecimiento del micelio y disminuye la cantidad de organismos contaminantes (Alemu et al., 2022; Nashiruddin et al., 2022). Sin embargo, se ha visto que el incrementar al 60% (p/p) puede reducir la producción de lacasas y puede afectar las características del material (Alemu et al., 2022; Nashiruddin et al., 2022). Posterior a la inoculación, se encuentra la fase de incubación y crecimiento del micelio, donde el tiempo de incubación depende de la especie, pero se ha observado que dentro de una misma especie la duración afecta las características del material (Alemu et al., 2022; Ghazvinian & Gürsoy, 2022; Manan et al., 2021).

Una vez que se finaliza el crecimiento, se puede utilizar el material vivo, pero para biomateriales se realiza un proceso de deshidratación o secado, removiendo el agua del sustrato y micelio, donde se puede detener el crecimiento o matar el hongo (Houette et al., 2022; L. Yang et al., 2021). Este proceso crea materiales secos, fuertes y livianos, pero el tamaño del material seco puede reducirse respecto al húmedo (Elsacker et al., 2019; Sivaprasad et al., 2021; L. Yang

et al., 2021). Las temperaturas de secado pueden variar y esto depende del objetivo para el cual se desee el material, pero van desde los 40°C por aprox. 12 horas, donde puede que el hongo no muera (Houette et al., 2022; Vašatko et al., 2022) o en temperaturas donde se muere el micelio en 60, 70, 90, 100 o 140°C (Attias et al., 2020; Elsacker et al., 2019; Houette et al., 2022; Lee & Choi, 2021; Mohd et al., 2022; Nashiruddin et al., 2022; Sivaprasad et al., 2021). Se han utilizado diferentes métodos de secado, desde secado en lámparas, en horno infrarrojo, en horno convencional, el secado solar o en horno con circulación de aire (Manan et al., 2021). Dependiendo del método utilizado, el material puede no secarse totalmente y posea de 0.6% a 20% de humedad final, por lo que el método de secado en horno con aire circulando puede ser la mejor opción (Manan et al., 2021).

### **2.3. Características importantes en los biomateriales.**

Una vez listo el material se pueden analizar diferentes características y usos. Posterior al secado se ha analizado la reducción en peso y la reducción en volumen del material, puede reducirse alrededor del 50% de su peso húmedo y en volumen entre un 5%-20% (Elsacker et al., 2019; Houette et al., 2022). Dentro de las pruebas realizadas se encuentran las caracterizaciones mecánicas; como las pruebas de compresión, donde la fuerza de compresión se encuentra relacionada a la densidad del material seco (Houette et al., 2022; Joshi et al., 2020; Nashiruddin et al., 2022). Por lo que el valor de densidad es una característica importante de calcular, usualmente una alta densidad indica buen crecimiento de micelio, pero también depende del sustrato empleado (Appels et al., 2019; Arifin & Yusuf, 2013; Attias et al., 2020; Elsacker et al., 2019; Houette et al., 2022; Joshi et al., 2020; Nashiruddin et al., 2022).

Otra característica que se analiza en muchos estudios es la capacidad de adsorción de agua, importante de conocer como factor en diversas aplicaciones. Se puede analizar a través de varios métodos, como por ejemplo, mediante acción capilar (Vašatko et al., 2022), solamente colocando el material en un ambiente con alta humedad (Antinori et al., 2020) o colocando el material flotando, sumergiéndolo parcialmente o totalmente en agua (Appels et al., 2019; Attias et al., 2020; Dias et al., 2021; Elsacker et al., 2019; Joshi et al., 2020; Lee & Choi, 2021). Cuando se sumerge, el material se pesa cada cierto tiempo, donde usualmente se deja hasta 96 horas (Attias et al., 2020; Lee & Choi, 2021; Sivaprasad et al., 2021) o hasta que se observe un punto de saturación donde el peso no cambie lográndose un peso constante (Dias et al., 2021;

Sivaprasad et al., 2021). En términos de porcentaje de incremento en el peso, o la cantidad absorbida de agua, por parte del biomaterial, puede rondar entre 40-580% (Appels et al., 2019; Attias et al., 2020; Dias et al., 2021; Joshi et al., 2020; Lee & Choi, 2021; Sivaprasad et al., 2021). A pesar de que puede absorber gran cantidad de agua, se observa que el material conserva su forma y el micelio queda intacto adherido al sustrato (Attias et al., 2020; Joshi et al., 2020; Sivaprasad et al., 2021). El micelio es hidrófobo y podría funcionar como repelente de agua, sin embargo, el sustrato junto con el micelio genera una superficie no homogénea donde se generan poros, y una alta porosidad genera una mayor absorción de agua (Antinori et al., 2020; Dias et al., 2021; Joshi et al., 2020; Vašatko et al., 2022).

#### **2.4. Materiales, sustratos y hongos en biosorción.**

Este tipo de biomateriales como tal, todo el bloque o matriz completa del material, no se ha utilizado como biosorbente o en biofiltros, aunque si se han investigado los materiales por aparte. Por ejemplo, solamente se ha investigado el vegetal tipo desechos o partes de plantas (Shahsavari et al., 2013; Sud et al., 2008) y solamente el hongo o en conjunto a algún sustrato orgánico o inorgánico (Barh et al., 2019; Yadav et al., 2021). Se ha investigado el uso de material o desechos vegetales para remoción de contaminantes como tintes (Hameed, 2009; Lafi et al., 2015), hidrocarburos (Shahsavari et al., 2013) y en mayoría metales pesados o metaloides (Abdolali et al., 2016; Cobos et al., 2009; Dubey & Mishra, 2017; Mongiov et al., 2021; Saeed et al., 2005). Dentro de los metaloides se ha observado la adsorción de As por parte de diversos materiales vegetales, entre estos la cáscara de sandía (Shakoor et al., 2018), la cáscara de maracuyá (Iliná et al., 2009), la corteza de árboles (Mumtazuddin & Azad, 2012) y el pasto (Saikia et al., 2017). Dentro de los pastos o tipos de paja, el proceso generalmente utilizado conlleva a lavado, secado hasta peso constante y particionado del material (Hameed, 2009; Saikia et al., 2017; Shahsavari et al., 2013) o ser pirolizado para formar un biocarbón (Saikia et al., 2017).

Estos materiales vegetales pueden ser usados como sustrato para crecimiento de diversas especies de hongos empleadas en la adsorción de contaminantes. Dentro de especies de hongos y materiales vegetales que se utilizan y poseen buena eficiencia se puede encontrar *Fusarium* sobre diversos sustratos y combinaciones, entre estos paja de trigo (Pavlov & Litovka, 2021). *Phanerochaete chrysosporium* Burds. sobre tallo de papaya (Iqbal et al., 2007; Iqbal & Saeed,

2006, 2007), *G. lucidum* sobre aserrín de haya y salvado de trigo (Rozman et al., 2020), *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach sobre paja de trigo (García-Delgado et al., 2017) o *P. ostreatus* sobre trigo (Georgescu et al., 2019; Pini & Geddes, 2020). En otros estudios se ha utilizado *P. ostreatus* en sustrato vegetal pero no se especifica de que tipo (Jin et al., 2018; Kamarudzaman et al., 2013; Tay et al., 2011).

## **2.5. Procesos para realizar la biosorción.**

El proceso general para utilizar estos materiales en biosorción conlleva secado en horno, particionado en partículas pequeñas y tamizado para elegir tamaños de partícula determinados (Georgescu et al., 2019; Hanif et al., 2015; Jin et al., 2018; Kamarudzaman et al., 2013; Rozman et al., 2020; Tay et al., 2011). En algunos otros se utiliza todo el material sin particionar (Gloriaikechi-nwogu et al., 2020; Iqbal et al., 2007; Iqbal & Edyvean, 2005; Iqbal & Saeed, 2006, 2007; Pavlov & Litovka, 2021). También, se puede inmovilizar la biomasa en algún medio y esto puede mejorar la biosorción y a la vez, posterior al proceso, facilitar la extracción del material (Rangabhashiyam et al., 2014).

El proceso de biosorción y de filtración de los contaminantes se puede realizar de distintas maneras. Por ejemplo, se han utilizado biofiltros donde se coloca el sustrato en un recipiente plástico con agujeros en el fondo, se le añade el inóculo del hongo, se deja crecer, y posterior a esto se filtra o percola el agua una sola vez (Taylor et al., 2015). Se realizan sistemas de filtros o reactores con lecho fijo, esto consiste en colocar el sustrato empacado en una columna cilíndrica y el contaminante pasa por toda la columna (Bruneel et al., 2020; García-Delgado et al., 2017; Ghasemi et al., 2020; Jin et al., 2018). El sistema más empleado para analizar la biosorción de un material, entre estos utilizado *P. ostreatus*, es un biorreactor discontinuo o tipo batch; consiste en un recipiente que contiene el líquido con el contaminante, al cual se le añade una cantidad del material para adsorber y se coloca en un agitador o algún equipo que permita el movimiento y flujo del líquido (Chen et al., 2014; Georgescu et al., 2019; Javaid et al., 2011; Jin et al., 2018; Kamarudzaman et al., 2013; Ramanaiah et al., 2007; Tay et al., 2011).

## **2.6. Factores dentro del proceso de biosorción**

Dentro de los factores que se toman en cuenta para estos métodos es el tiempo de contacto entre el material y el contaminante, el tiempo óptimo puede variar dependiendo de la naturaleza del contaminante y del material usado como biosorbente. Se observa en general que en los primeros minutos se da un pico de adsorción, luego decrece gradualmente hasta llegar a un equilibrio y a un punto de saturación; esto sucede debido a que en un principio hay muchos sitios disponibles y luego estos se van ocupando (Georgescu et al., 2019; Hanif et al., 2015; Iqbal et al., 2007; Iqbal & Edyvean, 2005; Kamarudzaman et al., 2013; Ramanaiah et al., 2007; Tay et al., 2011). El tiempo para alcanzar el equilibrio puede variar desde los tres a los 240 minutos (Amin et al., 2015; Chen et al., 2014; Hanif et al., 2015; Ramanaiah et al., 2007; Tay et al., 2011). Otro factor a considerar es el movimiento o el flujo del líquido, la mayoría de las ocasiones es un parámetro fijo, pero se ha observado que es importante asegurar un buen flujo para que las partículas del contaminante alcancen las capas más inaccesibles y esos sitios de unión se puedan aprovechar (Javaid et al., 2011).

La cantidad o dosis de material adsorbente es importante debido a que generalmente una mayor cantidad de material tendrá una mayor adsorción, sin embargo, se puede llegar a un punto donde no se genera un incremento o donde decrece (Amin et al., 2015; Chen et al., 2014; Georgescu et al., 2019; Hanif et al., 2015; Kamarudzaman et al., 2013; Tay et al., 2011). El tener mayor cantidad de biomasa genera un aumento en la cantidad y área de sitios para que el contaminante se una, pero, en gran cantidad se genera un efecto de película o agregación de material donde decrece la adsorción (Amin et al., 2015; Chen et al., 2014; Georgescu et al., 2019; Hanif et al., 2015; Kamarudzaman et al., 2013; Tay et al., 2011). Por lo tanto, también será importante el tamaño de partícula, ya que generalmente un menor tamaño genera mayor área de adsorción pero en algunas ocasiones puede que no sea significativo (Abdolali et al., 2016). Luego, se ha observado, en algunas ocasiones, que un material sin particionar puede ser igual o más eficiente (Iqbal & Edyvean, 2005). Por ejemplo, al combinar el sustrato con el hongo se podría generar suficiente espacio o poros para que las partículas del contaminante accedan a varios sitios de unión (Iqbal & Edyvean, 2005).

## **2.7. Parámetros y métodos para remoción de arsénico.**

Para remoción de arsénico en agua algunos de estos parámetros se han evaluado tanto en material vegetal como con hongos. Para el tiempo de contacto se alcanza el equilibrio de adsorción desde 30-60 minutos, 100 minutos, 2 horas o hasta las 24 horas (Cárdenas-González et al., 2017; Iliná et al., 2009; Mohebbad et al., 2019; Santos et al., 2017; Sari & Tuzen, 2009; Shakoor et al., 2018; Sumalatha et al., 2017; Xue & Peng, 2014). En cuanto a la cantidad o dosis de material adsorbente se encuentran mayores eficiencias con 1g/L (Mohebbad et al., 2019; Shakoor et al., 2018) y en otros en 5g (Cárdenas-González et al., 2017; Santos et al., 2017). También se ha observado que con cantidades altas de material, cuando es particionado o unicelular, puede formar agregados disminuyendo la movilidad del material y de sitios activos (Mohebbad et al., 2019).

En la actualidad para el tratamiento de As existen diversos métodos mediante los cuales se puede remover del agua. Estos métodos utilizan principios químicos, físicos o biológicos (Collivignarelli et al., 2019), como la oxidación química y biológica, precipitación, electrocoagulación, intercambio iónico, separación (membranas), fotocatalisis y la adsorción (Bhakta & Ali, 2020; Collivignarelli et al., 2019; Kumar et al., 2019). Actualmente, algunos acueductos del AyA trabajan con plantas de remoción de As, mediante un proceso de adsorción-filtración (Arias-Barrantes et al., 2019). Además, una institución privada, ha utilizado otro método con filtros con granulados especiales (Litter et al., 2020). A manera de investigación se han utilizado los métodos de coagulación, floculación con materiales sintéticos o naturales y materiales adsorbentes locales (Litter et al., 2020). La eficiencia de estos métodos varía entre ellos, pero todos presentan limitaciones asociadas a su costo y dificultad de operación, por ejemplo, pueden dejar algunos elementos secundarios que podrían afectar el agua y se deban aplicar procesos posteriores adicionales.

### 3. JUSTIFICACIÓN.

*Pleurotus ostreatus* es capaz de degradar lignina, celulosa y hemicelulosa (Chang et al., 2018; Palin et al., 2016; Vaverková et al., 2018). Por lo tanto, este hongo puede crecer y ser cultivado en diversos sustratos lignocelulosos; además, presenta ventajas para su investigación debido a que se adapta fácilmente, es de fácil manejo, posee un crecimiento relativamente rápido y su cultivo o elaboración de biomateriales es de bajo costo (Kapahi & Sachdeva, 2017; Palin et al., 2016; Vaverková et al., 2018).

Debido a esto *P. ostreatus* es ampliamente empleado en distintas aplicaciones o procesos, entre estos la formación de materiales a partir de su micelio (L. Yang et al., 2021) o la biosorción de contaminantes presentes en medio líquido (V. Kumar & Dwivedi, 2021). Por ejemplo, usando una matriz de paja de arroz con el hongo, para remoción de *Escherichia coli* (Pini & Geddes, 2020) o su uso para remover hidrocarburos, contaminantes agrícolas, tintes o productos farmacéuticos, así como de su amplio uso y eficiencia para remover metales pesados (Akhtar & Mannan, 2020; Kapahi & Sachdeva, 2017). También, en cuanto a formación de biomateriales para sustituir poliestireno o formar bloques (Joshi et al., 2020; Nashiruddin et al., 2022; Sivaprasad et al., 2021).

En Costa Rica, en el año 2008, se analizaron fuentes de agua para cuantificar la presencia de As, encontrándose concentraciones muy por encima del nivel permitido por el Ministerio de Salud, en aguas superficiales de la zona norte del país, (Litter et al., 2020). Entre los años 2013 a 2017, en las regiones Huetar Norte y Chorotega, se encontraron altos niveles de As en el agua; siendo los distritos de Bagaces y Cañas (región Chorotega), así como Agua Zarcas y Los Chiles (Huetar Norte) los sitios con mayor contaminación (Herrera-Murillo et al., 2019). Mas recientemente, en marzo del 2020, el Instituto de Acueductos y Alcantarillados (AyA) de Costa Rica informó de la prevención del consumo de agua del acueducto de Bagaces, debido a un aumento en los niveles de As (Rodríguez, 2020). Esta problemática sigue siendo de importancia en el país y en muchos lugares rurales con fuentes de agua contaminadas se está lejos de encontrar soluciones.

Los procesos de biosorción pueden significar una alternativa viable para la remoción de contaminantes presentes en agua como el arsénico. Por lo tanto, surge la idea de explorar una opción mediante un proceso formando un biomaterial basado en el micelio de *P. ostreatus*,

inmovilizado en un medio vegetal. Esto podría significar el encontrar avances en la investigación para la utilización de este tipo de métodos mediante el uso de materiales o bloques basados en micelio. Para, a futuro, obtener procesos de bajo costo, fácil manejo operacional y con una alta eficiencia de remoción de contaminantes; con la mira de su utilización en sistemas a gran escala o de uso doméstico en áreas rurales que no cuenten con recursos suficientes.

#### **4. HIPÓTESIS DE TRABAJO.**

Combinando un sustrato comercial como el heno (*D. eriantha*) con una cepa comercial del hongo *P. ostreatus* se obtiene un material con características deseables para procesos de biosorción. Se esperó estandarizar un protocolo para la creación de biomateriales a base de micelio de hongo y que se adapte a las condiciones presentes en el país. Al ser usado este material o biofiltro en procesos de biosorción de arsénico, se obtuvo un posible uso como material adsorbente de arsénico en aguas contaminadas y proponiendo un nuevo sistema de biosorción tipo batch con flujo lento.

#### **5. OBJETIVO.**

##### **5.1. Objetivo general.**

Desarrollar un biomaterial o biofiltro a partir de una matriz mixta de sustrato orgánico comercial junto al micelio del hongo *Pleurotus ostreatus*, para evaluar su capacidad de remoción de Arsénico en agua.

##### **5.2. Objetivos específicos:**

1. Caracterizar el crecimiento de una cepa de *P. ostreatus* sobre una matriz de sustrato orgánico comercial con distinta cantidad de masa, para determinar la curva de crecimiento del hongo y la porosidad del material resultante.
2. Evaluar la cinética de crecimiento de la cepa de *P. ostreatus* sobre el heno, para elaborar un material con forma y tamaño determinado (molde).

3. Determinar las propiedades físicas e hidráulicas del material formado a partir de la matriz de sustrato orgánico y el micelio del hongo.
4. Probar el material en un proceso de filtrado lento de agua contaminada con Arsénico y medir la eficiencia de remoción del metal por parte del material.

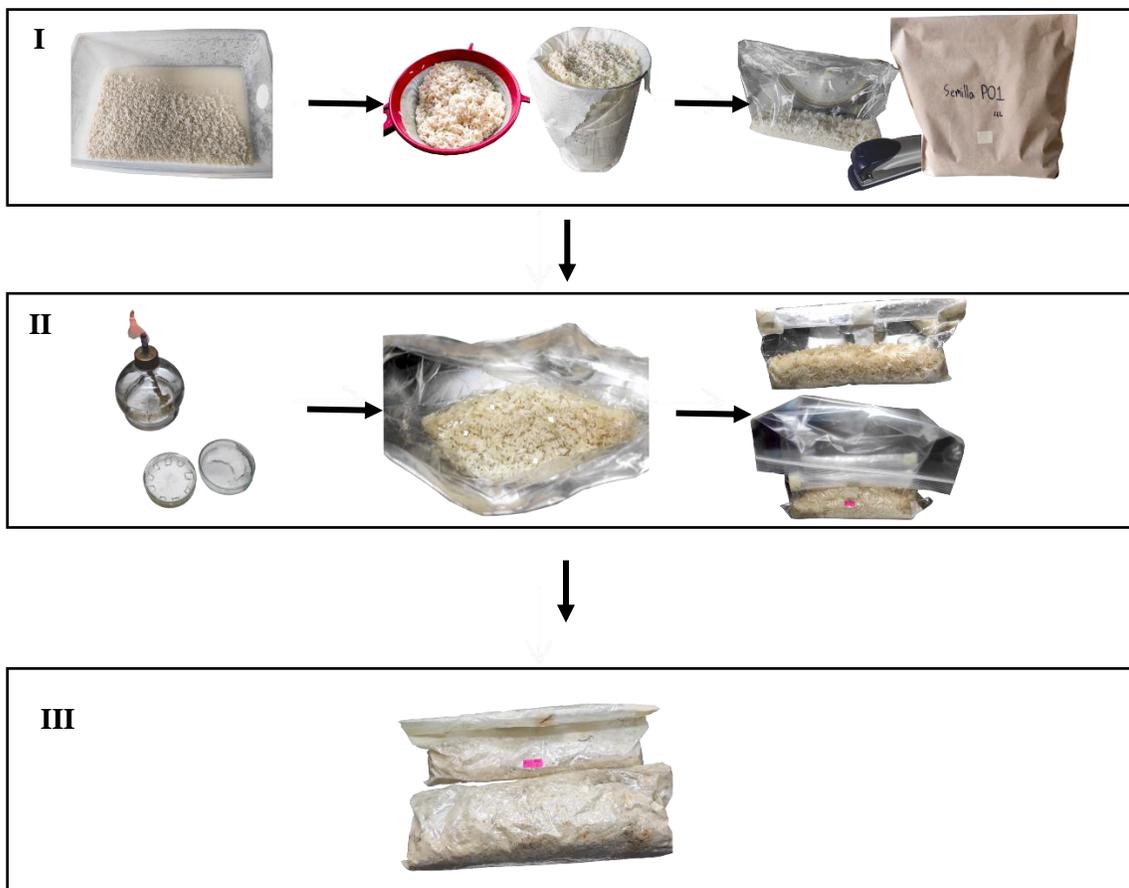
## 6. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 6.1. Producción de inoculo primario de *P. ostreatus* (Objetivos específicos (OE) 1 y 2).

Se utilizó una cepa comercial de primera generación de *P. ostreatus* comprada en Total Fungi, la cual se cultivó en un medio de Papa Dextrosa Agar (PDA) de la marca Sigma siguiendo las instrucciones del fabricante (colocando 39g de PDA en 1L de agua destilada), y autoclavando el medio a 121 °C a 15 psi por 45 minutos. Se incubó a 25 °C en oscuridad por 20 días. A partir de este inóculo primario se realizaron los inóculos secundarios para duplicar la cepa y la semilla del hongo. Este procedimiento se dividió en 3 fases. Para la fase I de la elaboración de la semilla (Figura 1) se utilizó arroz blanco comercial, el cual se colocó en un recipiente plástico de 7 L, se limpió con 3 cambios de agua destilada a temperatura ambiente y posteriormente se dejó inmerso en agua por 12 horas. Se escurrió el agua con un colador y se pasó ligeramente una toalla de papel para eliminar el exceso de agua, se colocó en un beaker de 2 L con papel toalla, se comprobó la humedad con la mano (comprobando que ésta no quedó mojada al contacto) e igualmente se comprobó al reventar algunos granos con el dedo. Se colocaron 300g de arroz en bolsas de polipropileno, doblando la apertura una sola vez y sellando con grapas, posteriormente, esta bolsa se introdujo en sobres de papel Kraft y se autoclavó por 40 minutos a 121°C y 15 psi.

Para la fase II (Figura 1), posterior a la autoclave, las bolsas con arroz se dejaron enfriar dentro de una cámara de flujo laminar (marca High Ten HH-4) cuya superficie fue previamente desinfectada con alcohol etílico al 80%. Una vez a temperatura ambiente, se colocaron dentro de cada bolsa 10 cuadros de 1cm<sup>2</sup> del inoculo primario, cortados con bisturí estéril, asegurándose que estuvieran completamente colonizados por el hongo y principalmente de los bordes de

crecimiento. La bolsa con el arroz y el inóculo se homogenizó con movimientos leves hasta mezclar completamente. Se cerró la bolsa enrollando desde la apertura de la bolsa y dejando un espacio de aire, sellando la bolsa con cinta adhesiva e introduciéndose en una bolsa con cierre hermético. Las bolsas fueron incubadas a 25°C en oscuridad hasta que el arroz estuvo completamente colonizado y formó un bloque compacto (Fase III figura 1). Cumplido el crecimiento se almacenó en cámara refrigerada a 4°C hasta su uso.



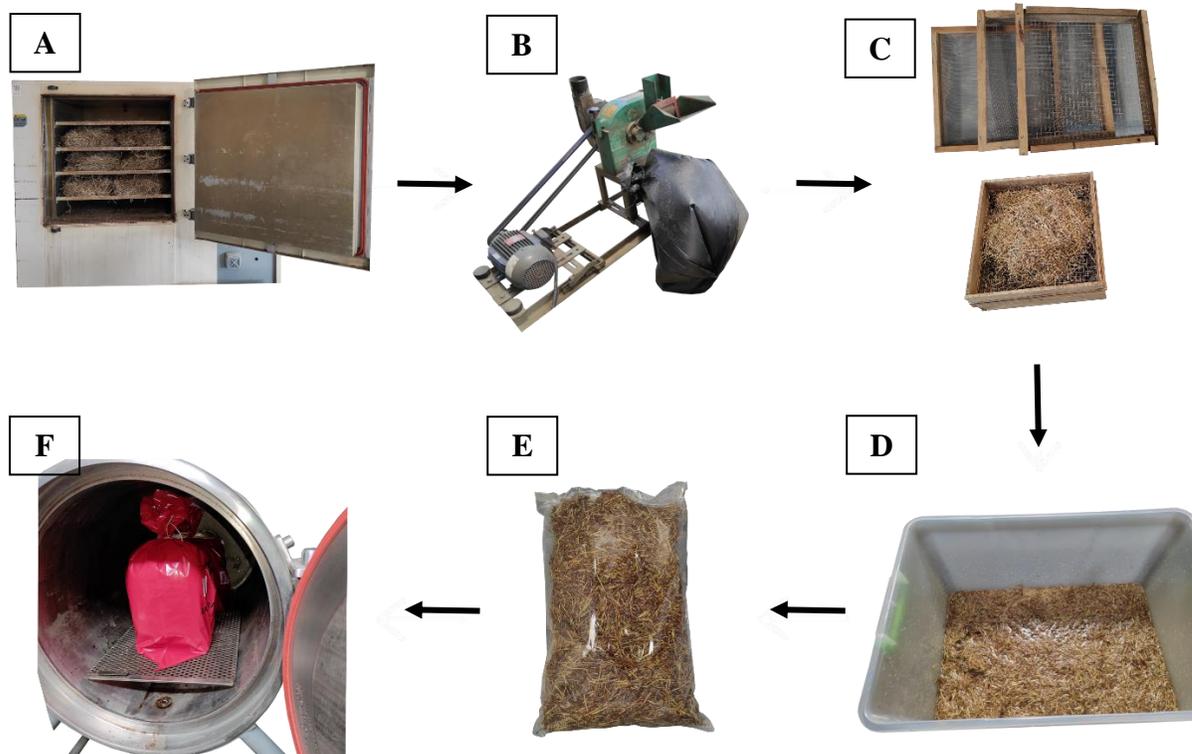
**Figura 1.** Procedimiento de preparación del inóculo primario de *Pleurotus ostreatus* usando como sustrato arroz blanco comercial. Fase I: preparación y esterilizado del arroz, Fase II: inoculado del arroz mediante cuadros de cultivo PDA con micelio de *P. ostreatus*, Fase III: Incubación y resultado final de la semilla.

## 6.2. Preparación del sustrato de heno (OE 1 y 2).

Se eligió el heno o paca transvala (*D. eriantha*) como sustrato vegetal, ya que, en una investigación por tutoría realizada durante el segundo semestre del 2019, donde se analizó

también el bagazo de caña, se determinó que el heno ofrecía mejores características, como la densidad del micelio y una menor contaminación. El heno se adquirió en una tienda de insumos agrícolas de la empresa Dos Pinos, y es pasto o heno seco sin espigas verdes. Para eliminar la humedad del sustrato, se colocó en un horno a 70°C con flujo de aire por 24 horas (Figura 2A). Posterior al secado, el heno se particionó empleando un molino de martillo (Figura 2B) y fue tamizado mediante tres tamices; uno con malla de 10mm, otro de 7,5mm y el tercero con malla de 4mm, recogiendo el sustrato que quedó en el segundo tamiz (Figura 2C). Por lo que se trabajó con un tamaño de partícula de longitud comprendida entre los 4 – 10mm. Lo anterior realizado para homogenizar el sustrato, sin embargo, a pesar de esta homogenización se pueden encontrar partículas de 10-30 mm de longitud en el sustrato empleado, debido a que el heno es muy espigado.

Posteriormente, el sustrato fue lavado para eliminar partículas pequeñas y polvo, y para eliminar algunos pigmentos. En total, se realizaron 10 cambios de agua (figura 2D). En cada cambio de agua, el sustrato se fue mezclando y estrujando manualmente, hasta observar el agua sin suciedad o pigmentación. Posteriormente, se enjuagó con dos cambios de agua destilada. Con esto el sustrato quedó húmedo y, mediante la prueba del puño al apretar el sustrato, se verificó que no derramó agua, indicando una humedad adecuada para ser usado en el experimento. Posteriormente, se introdujo el heno en bolsas de polipropileno cerrando la apertura de la bolsa con grapas e introduciendo estas bolsas en otra bolsa de polipropileno y cerrando el extremo con cuerda (Figura 2E). Se autoclavó por 60 minutos a 121°C y 15 psi (Figura 2F). Al finalizar, se dejó enfriar en la cámara de flujo laminar previamente desinfectada. Una vez que el sustrato estuvo a temperatura ambiente, se procedió con la siembra o inoculación.



**Figura 2.** Preparación del sustrato de heno *Digitaria eriantha* (A: secado en horno, B: particionado, C: tamizado, D: lavado, E: empaclado del heno y F: autoclavado).

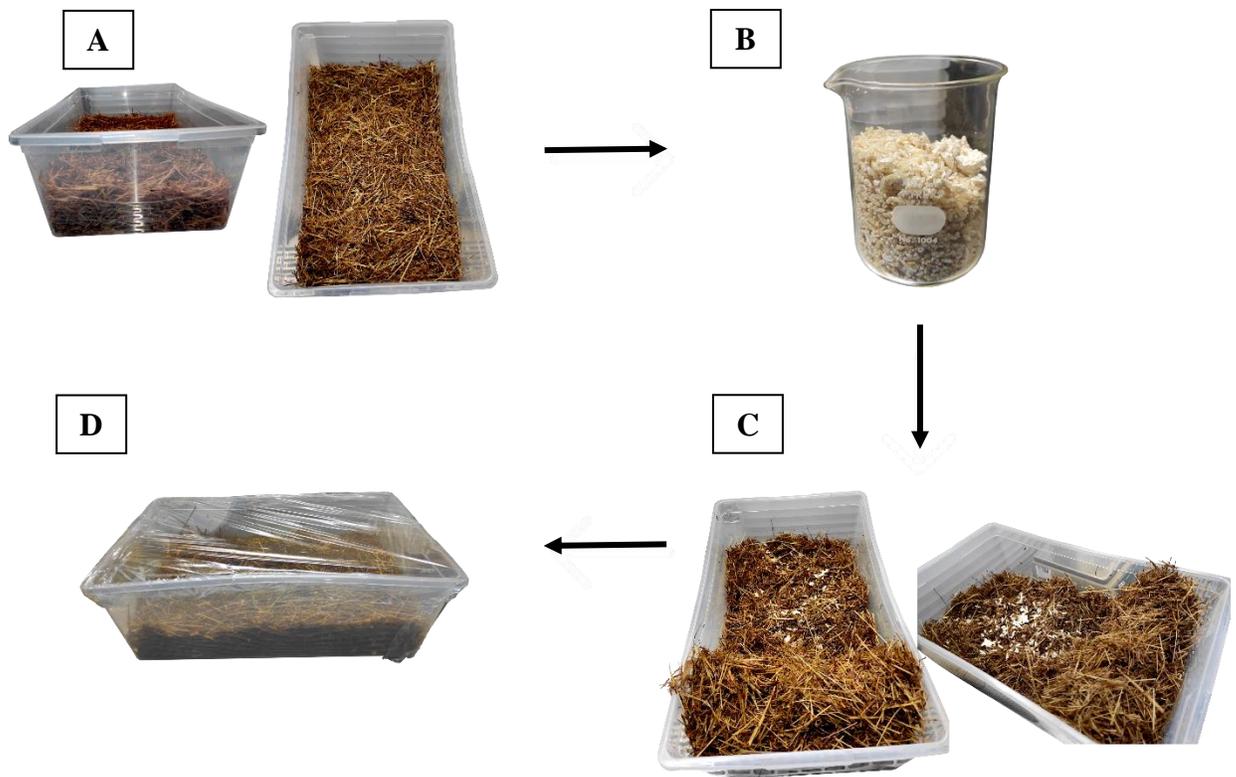
### 6.3. Cinética de crecimiento de *P. ostreatus* en molde y elaboración del biofiltro (OE 1 y 2).

Para la elaboración del biofiltro se usó como molde un recipiente de plástico polipropileno de 7L con dimensiones de 18 cm x 30 cm x 11 cm. Este se desinfectó primeramente con desinfectante Lysol, esperando hasta 30 minutos para luego limpiar con papel toalla, posteriormente limpiando con alcohol etílico al 80% dentro de la cámara de flujo laminar. Para llenar el molde se usó la semilla del hongo y el sustrato de heno preparados previamente. Cada recipiente se llenó a una altura, peso y compactación determinada y se establecieron dos tratamientos con 12 réplicas en cada tratamiento (Figura 3<sup>a</sup>). Para cada réplica se colocó una cantidad de semilla de *P. ostreatus* equivalente al 30% del peso del sustrato (relación 30% peso/peso) (Figura 3B). Para el tratamiento 1 (T1) se rellenó el recipiente hasta los 3 cm de altura, con un peso húmedo del sustrato de 200g y 60g de semilla del hongo, para un peso total de 260 g. Para el tratamiento 2 (T2) se rellenó el recipiente hasta una altura de 5 cm, con un peso húmedo de 350g y 105g de semilla, para un peso total de 455g. Cada vez que se añadió la

semilla se mezcló a mano para homogenizar el sustrato con la semilla (Figura 3C), hasta observar que quedó homogéneo y evitando comprimirlo para que quede a la altura establecida de 3 o 5 cm (dependiendo del tratamiento) y cuidando que quedaran espacios con aire dentro de la matriz.

Cada recipiente se selló con un filme plástico, al cual con una aguja de disección estéril se le realizó 5 hileras de 3 agujeros (Figura 3D), esto para asegurar el intercambio gaseoso del material. Se incubó a 25 °C, hasta que se alcanzará el crecimiento y densidad esperados (ver detalle más adelante). Como la incubadora no posee control de humedad, se introdujo un reloj higo-termómetro marca Extech 445702 (rango humedad relativa 10-85±6%) para asegurarse que la humedad relativa dentro de la incubadora se mantuviera cercana al 80%.

Cada dos o tres días se verificó la humedad y se asperjaba agua destilada sobre los recipientes dentro de las cámaras, además, mediante inspección visual se aseguró que siempre se mantuviera la humedad dentro del recipiente. Hasta el final del experimento, la humedad mínima observada fue al 60% y la máxima al 82%. A la vez, se inspeccionó que no existía contaminación por bacterias u otros hongos dentro del recipiente, y cuando la hubo se extrajo parte de la contaminación con ayuda de pinzas estériles, dentro de la cámara de flujo laminar.



**Figura 3.** Elaboración de biofiltro con micelio de *Pleurotus ostreatus* y heno (*Digitaria eriantha*) en molde plástico de 7L. A: se observa el sustrato y hasta dónde llega, este caso para 5cm de altura, B: semilla o inóculo de *P. ostreatus* en relación 30% peso/peso, C: adición y mezcla de la semilla con el sustrato y D: sellado con filme plástico con agujeros para la incubación.

#### **6.4. Mediciones de las características físicas e hidráulicas del Biofiltro.**

##### **6.4.1. Caracterización del crecimiento del micelio durante la formación del Biofiltro (OE 1 y 2).**

Con el objetivo de medir la cinética de crecimiento del micelio fúngico sobre el heno, se realizaron una serie de mediciones en las 12 réplicas de cada tratamiento (T1: 3cm y T2: 5cm), que fueron: la curva de crecimiento, la tasa de crecimiento, la densidad del micelio y el tiempo final de crecimiento. Para esto, se observaron las réplicas cada dos o tres días (se tomaron mediciones los lunes, miércoles y viernes). Se estableció que el biofiltro alcanzaría el tiempo final de crecimiento, una vez que el micelio visible del material estuviera denso, compacto y muy blanco sin transparencias. Conforme cada bloque iba alcanzando estas características, se

fue colocando en un horno con flujo de aire a 60°C durante 24h, con el objetivo de producir un choque térmico secando el material.

Para cuantificar la curva y la tasa de crecimiento, se midió el porcentaje de área abarcado por el micelio, ya que como la semilla se homogenizó en el sustrato, había más de un punto de crecimiento en cada réplica. Esta medición se realizó utilizando la formula [1]. Se realizaron fotografías a las réplicas tomando dos fotos por cada día de muestreo, una foto de la cara superior (abriéndose el filme plástico y volviéndolo a colocar) y otra foto de la cara inferior del biofiltro dentro del molde (Figura 4). Todo dentro de una cámara de flujo laminar para evitar contaminación. Las imágenes y las áreas se calcularon con el software ImageJ 1.8.0\_112. La tasa de crecimiento (cm<sup>2</sup>/días) se determinó a partir del valor de la pendiente de la curva.

$$\text{Área micelio (\%)} = \left( \frac{\text{Área micelio (cm}^2\text{)}}{\text{Área total sustrato (cm}^2\text{)}} \right) * 100 \quad [1]$$



**Figura 4.** Fotografías tomadas de la cara superior e inferior del biofiltro con micelio de *Pleurotus ostreatus* y heno (*Digitaria eriantha*). Se utilizaron para ser analizadas mediante el software ImageJ 1.8.0\_112 para calcular el área abarcada por el micelio. Estas fotografías muestran el quinto día de crecimiento del micelio.

La densidad del micelio sobre el sustrato se observó de manera cualitativa, mediante inspección visual, los mismos días de muestreo especificados previamente (Figura 5). Se

establecieron cinco categorías de densidad cualitativa: (i) densidad uno cuando el material tuvo sitios sin micelio y este fue muy transparente, (ii) densidad dos cuando el micelio coloniza la mayoría del material y la mayoría del micelio es aún transparente, (iii) densidad tres con la mitad o un poco más del micelio blanco denso con algunos sitios blanco transparentes aún, (iv) densidad cuatro cuando el micelio en su mayoría es blanco con algunos sitios blanco semitransparente y (v) densidad cinco cuando todo el material tuvo micelio blanco (Figura 5). El tiempo final de crecimiento se tomó como el último día en que el material alcanzó el 100% de colonización del micelio y la categoría cinco de densidad. En ese momento, se realizó el choque térmico.



**Figura 5.** Densidad cualitativa del micelio de *Pleurotus ostreatus* creciendo sobre heno (*Digitaria eriantha*) formando el biofiltro. Mostrando la progresión desde la densidad uno (i) a la densidad cinco (v). Para cada densidad se muestra del lado izquierdo la vista de la cara superior y del lado derecho la vista de la cara inferior.

#### **6.4.2. Medición de características físicas e hidráulicas del Biofiltro (OE 3).**

Se determinaron las siguientes variables físicas e hidráulicas del biofiltro. Variables físicas como: el cambio de forma del biofiltro, la densidad aparente del biofiltro, la porosidad aparente. Y variables hidráulicas como: la capacidad de absorción de agua realizando una curva de absorción de agua, calculando el tiempo de saturación del biofiltro, el porcentaje de absorción de agua, la tasa de absorción por tiempo de contacto con el agua y capacidad de absorción por peso del biofiltro.

Una vez los bloques del biofiltro alcanzaron el crecimiento y densidad deseados, y antes de realizar el choque térmico, se pesó cada bloque para determinar el peso húmedo ( $p_h$ ) de cada réplica. Posterior al secado, los bloques se pesaron nuevamente para determinar el peso seco del material ( $p_s$ ). También se determinó el volumen ( $cm^3$ ) del material en seis replicas por tratamiento, midiendo la longitud (cm), el ancho (cm) y la altura (cm); para cada medición de la altura se tomaron tres mediciones por lado, una en el medio y las otras dos cerca del extremo del lado calculado (Figura 6). De igual manera, también se determinó el porcentaje en cambio de forma [2], se determinó si el biofiltro posterior al secado cambia de forma. A partir del peso seco y el volumen se determinó la densidad aparente para seis réplicas ( $g/cm^3$ ) del biofiltro. Se calculó la porosidad aparente de seis replicas por tratamiento [3] usando peso seco, peso húmedo y el peso saturado ( $p_{sa}$ , ultimo peso obtenido en la determinación de la capacidad de adsorción, (Arifin & Yusuf, 2013).

$$\text{Cambio de forma (\%)} = \left( \frac{\text{volumen húmedo (cm}^3\text{)} - \text{volumen seco (cm}^3\text{)}}{\text{Volumen húmedo (cm}^3\text{)}} \right) * 100 \quad [2]$$

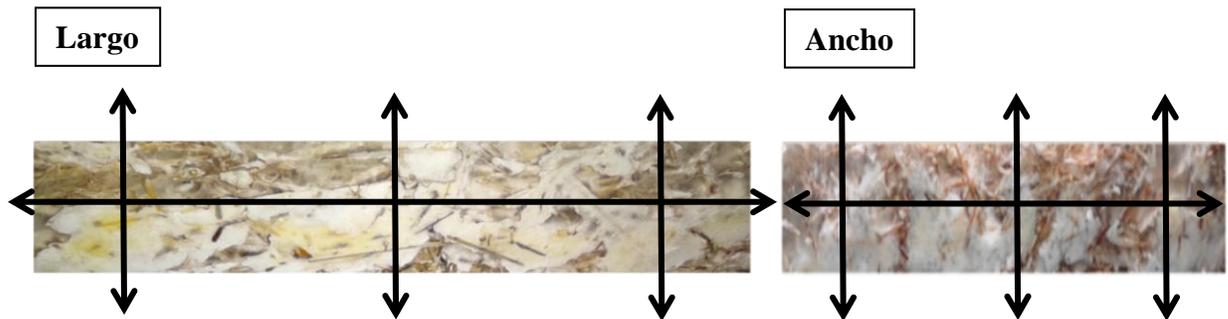
$$\text{Porosidad aparente (\%)} = \frac{p_s - p_h}{p_s - p_{sa}} * 100 \quad [3]$$

La capacidad de absorción de agua del biofiltro se determinó realizando una curva de absorción de agua, tiempo de saturación del biofiltro, porcentaje de absorción de agua, tasa de absorción (mL/hora) y capacidad de absorción (mL/g). Para cuantificar estas variables en 3 réplicas por cada tratamiento, cada bloque se colocó en un recipiente que contenía 5L de agua destilada, se sumergió y se soltó hasta que quedó flotando en la superficie. Cada media hora se extrajo el bloque, se colocó sobre una toalla de papel y otra toalla se pasó ligeramente sobre la cara superior, se procedió a pesarlo y se colocó nuevamente en el agua. Este proceso en que se extrae, se secó y se pesó cada bloque tardó un minuto por cada réplica; además, siempre se aplicó la misma técnica para secarlo ligeramente. Se pesó hasta que el biofiltro alcanzó un peso constante en al menos tres mediciones seguidas. Con el último peso, se determinó el peso saturado del biofiltro ( $p_{sa}$ ) y el tiempo donde se estabilizó la absorción se refiere al tiempo de saturación del biofiltro. La curva de absorción se calculó graficando el cambio de peso a través del tiempo, y con la pendiente de la curva se calculó la tasa de absorción del biofiltro. La

capacidad de absorción se determinó a partir de la cantidad de agua total absorbida [4] y el porcentaje de absorción mediante los pesos del biofiltro [5].

$$\text{Capacidad absorción} = \frac{\text{agua total absorbida (mL)}}{\text{peso seco (g)}} \quad [4]$$

$$\text{Absorción agua (\%)} = \left( \frac{p_{sa} - p_s}{p_s} \right) * 100 \quad [5]$$



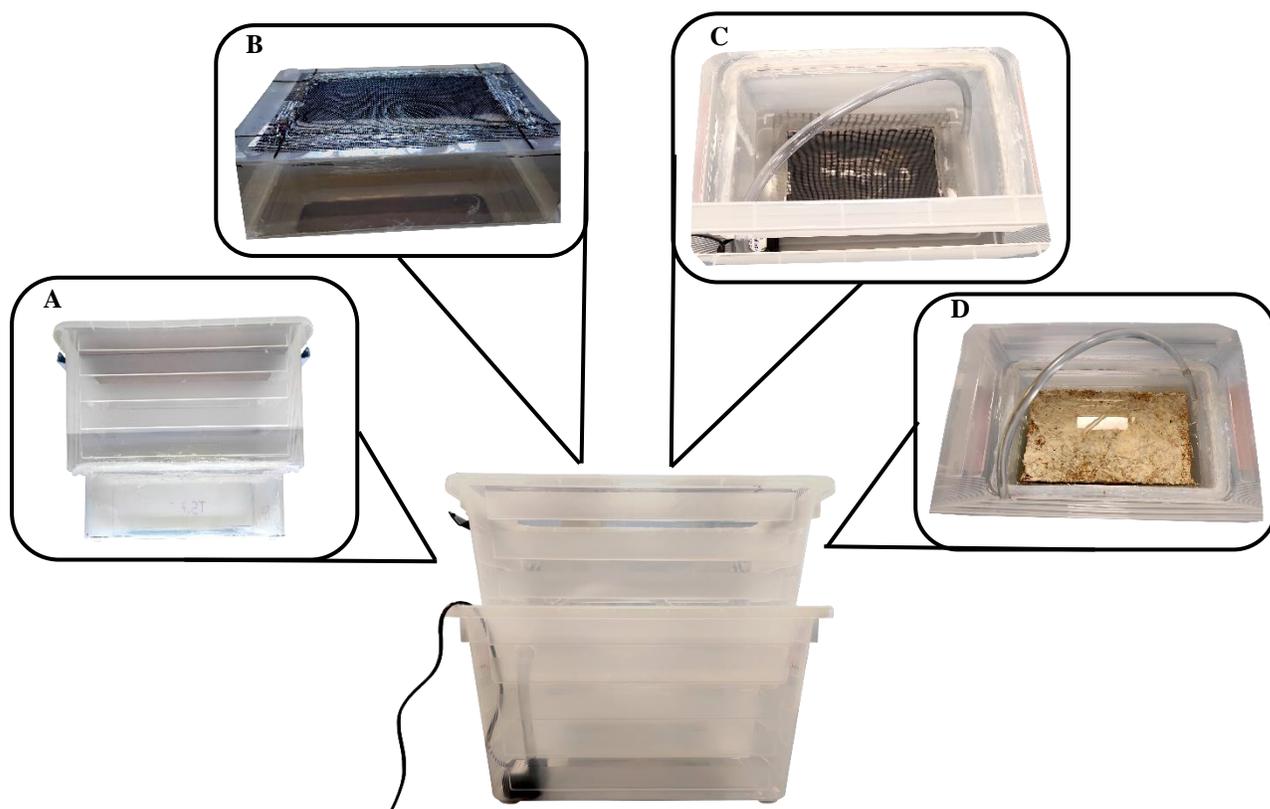
**Figura 6.** Mediciones realizadas del largo, ancho y altura para determinar el volumen seco del biofiltro de micelio de *Pleurotus ostreatus* creciendo sobre heno (*Digitaria eriantha*). Cada flecha indica una medición realizada; para la altura se realizaron tres mediciones en el largo y tres mediciones en el ancho, en los lugares que indican las flechas, promediando estas mediciones para obtener la altura.

## 6.5. Sistema de biofiltración para la biosorción de arsénico en agua con el biofiltro (OE 4).

### 6.5.1. Construcción del sistema de biofiltración

Se construyó un sistema de biofiltración de agua (SB) donde se colocó el biofiltro (Figura 7). El objetivo de este sistema fue probar la capacidad del biofiltro para absorber arsénico presente en agua. El SB donde se colocó el biofiltro y se analizó el agua contaminada con As se realizó con dos recipientes plásticos con capacidad de 24L y medidas de 32cm x 18cm x 45cm. A una de las cajas se le realizó una perforación de 30cm x 15cm en la base y en esta perforación se introdujo otro recipiente de 7L (igual al empleado como molde), sellando el recipiente a la base con silicón marca SISTA F109 (Figura 7A). A este recipiente de 7L se le realizó un orificio de 25cm x 10cm, en el cual se colocó una malla plástica con orificios de 1

mm<sup>2</sup>, la cual se selló con silicón (Figura 7B). Al recipiente anterior de 24L, se le realizó un orificio de 5cm de diámetro en uno de los laterales, por el cual se introdujo la manguera (descrita adelante). Al segundo recipiente de 24L se le realizaron unos orificios a los lados y se colocaron unas pestañas plásticas para sostener el recipiente anteriormente descrito (Figura 7A), y dentro de este segundo recipiente se colocó una bomba sumergible marca DoPhin P150 con un flujo máximo de 250L/hora. A la salida de esta bomba se le colocó una manguera que fue introducida por el orificio del primer recipiente pasando el agua de un recipiente a otro (Figura 7C). El biofiltro se colocó y se selló con silicón en el recipiente de 7L (usado como molde), este sellado evitando que el agua fluya por otro sitio que no sea el biofiltro (Figura 7D). Asegurando de este modo, que el flujo del agua siempre pasó por el biofiltro.



**Figura 7.** Sistema de biofiltración (SB) de agua donde se colocó el biofiltro del micelio de *Pleurotus ostreatus* creciendo sobre heno (*Digitaria eriantha*). A: recipiente superior de 24L donde se introdujo y se selló el recipiente más pequeño de 7L y con agujero, B: recipiente pequeño de 7L unido al recipiente plástico superior, se observa la malla plástica sellada al recipiente, C: interior del sistema observándose por un lateral la bomba sumergible (color negro)

en el recipiente inferior de 24L y pasando la manguera al recipiente superior de 24L y D: se observa el biofiltro sellado dentro del sistema y la manguera que mueve el agua.

### **6.5.2. Preparación del agua con arsénico.**

Para el SB se utilizó agua contaminada con arsénico, para la cual se preparó una solución de 60L con una concentración de 100 µg/L de As (III). La concentración se realizó agregando 6 mg de óxido de arsénico (III) As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> marca Riedel-de Haën en 60 L de agua destilada.

### **6.5.3. Parámetros de funcionamiento del SB.**

Para cada tratamiento, se probaron tres biofiltros o réplicas en el SB, para un total de seis biofiltros utilizados. En el SB, para cada réplica se colocó el filtro sellado con silicón. Posteriormente, después de transcurrir 24 horas desde el sellado del filtro, se añadieron 5L de agua con As, se encendió la bomba con flujo de 250L/hora, y se dejó la prueba durante 6 horas. Una vez transcurridas las 6 horas, se recogió una muestra de 250mL del agua filtrada y una muestra de 10g del filtro para analizar el contenido de As en ambas. Se analizaron 3 réplicas para cada tratamiento, cuantificando la concentración inicial de As en el agua ( $C_i$ ), la concentración final de As en el agua ( $C_f$ ), la concentración de As en el filtro después de utilizarlo en el sistema, el pH inicial y final del agua, y la demanda química de oxígeno (DQO) en el agua. Estos análisis se realizaron en el Centro de investigación en Contaminación Ambiental (CICA) de la Universidad de Costa Rica. A partir de las mediciones obtenidas, se calculó la eficiencia de biosorción (EB) [6].

$$EB (\%) = \left( \frac{C_i - C_f}{C_i} \right) * 100 \quad [6]$$

### **6.6. Análisis estadístico.**

Se realizó el análisis de las variables por medio de RStudio (versión 2022.07.2). En las variables de: la tasa de crecimiento del micelio, el tiempo final de crecimiento del micelio, la densidad cualitativa del micelio, el cambio de forma del biofiltro, la absorción de agua por parte del biofiltro y la absorción de agua por hora del biofiltro, no se encontró normalidad en los datos y se analizó por medio de la prueba U de Mann-Whitney. Analizando si las variables son iguales comparando los dos tratamientos. Se encontró normalidad en los datos de las variables de la densidad aparente del biofiltro, la porosidad aparente del biofiltro, la absorción de agua por

gramo del biofiltro y el porcentaje de absorción del biofiltro; por lo que se analizó si las variables son iguales entre los dos tratamientos mediante la prueba T de student. Se aplicó la prueba de Levene a todas las variables dentro de un mismo tratamiento, comprobando si la variabilidad de los datos de cada tratamiento es igual, y con esto observando si un tratamiento es más variable que el otro. Los datos de eficiencia de biosorción del biofiltro (EB), las concentraciones iniciales (Ci) y finales (Cf) de As en el agua, la concentración de As en los biofiltros, el pH del agua, y el DQO se presentan como observación, no se analizaron estadísticamente.

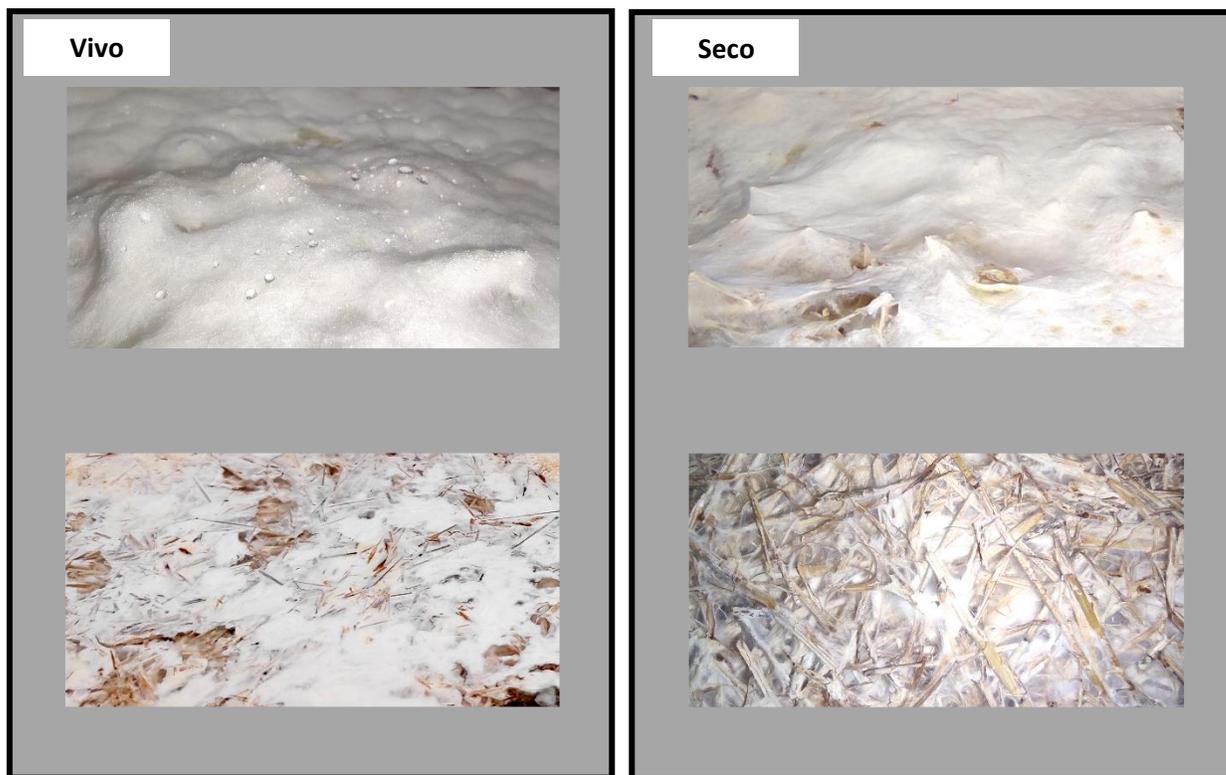
## **7. RESULTADOS.**

### **7.1. Descripción visual del biofiltro de *P. ostreatus* sobre heno**

Se caracterizaron de manera visual los detalles durante el crecimiento del micelio y el resultado final al realizar el choque térmico obteniendo el biofiltro. Al segundo día de observación, se encontraron muchos puntos de crecimiento de micelio que cubrió bastante área de la cara superior e inferior del sustrato. En todas las réplicas, para ambos tratamientos, los puntos de crecimiento aparecieron en todo el sustrato. Al quinto día, en la mayoría de las réplicas el sustrato estaba completamente colonizado por un micelio poco denso y translucido, con solo algunas replicas con sitios pequeños sin completar. Para el sétimo día, en dos de las réplicas, una de cada tratamiento, se presentó una pequeña contaminación por un hongo del género *Penicillium* en un pequeño sitio en ambas réplicas. La contaminación se eliminó y en los siguientes días de observación no apareció más y el micelio de *P. ostreatus* avanzó al sitio de la contaminación. Todavía con micelio vivo o húmedo en la cara superior del material, el micelio se observó denso y blanco, pero con apariencia algodonosa y sobresaliendo del sustrato (Figura 8). Por la cara inferior y las caras laterales, que estaban en contacto con el molde plástico, se observó un micelio denso y blanco, un poco más pardo, con una apariencia más dura tipo “piel”; y solamente en orificios que no estaban en contacto con las paredes se observaba con apariencia algodonosa (Figura 8).

El material mantuvo la forma durante el crecimiento del micelio, no se redujo y se mantuvo siempre unido a la pared del molde. Posterior al secado, sí se observó un cambio de forma disminuyendo su tamaño. En ambos tratamientos se formó un bloque compacto con porosidad visible en las superficies. En algunas réplicas del tratamiento uno (T1), se observó

más flexible y propenso a romperse, mientras que en el tratamiento dos (T2) esto no ocurrió. El micelio al secarse cambio en apariencia; el micelio algodonoso de la cara superior cambio de textura, la cual se volvió más tipo “piel” pero se evidencia menos rígido que el micelio de las caras laterales e inferior (Figura 8). El micelio de las caras laterales e inferior que estuvo en contacto con el molde no varió tanto la apariencia, pero, sí se observó un poco más rígido comparado al micelio húmedo o vivo (Figura 8). En general, en algunos pocos puntos del micelio se observó una ligera tinción de color pardo amarillento. Cuando se cuantificó la absorción de agua el biofiltro quedaba flotando sobre la superficie, y conforme pasaba el tiempo iba hundiéndose un poco, pero al final de la prueba igual quedó flotando. No se observó que el biofiltro cambiara de forma o una separación de los componentes, el agua al final quedo ligeramente teñida de color amarillento. En la prueba en el SB el biofiltro no se separó, ni se observó micelio separado; pero el agua del SB sí evidenció una tinción más pardo-amarillenta, comparado con la prueba de absorción de agua (sin flujo de agua), si se observó una coloración más oscura.

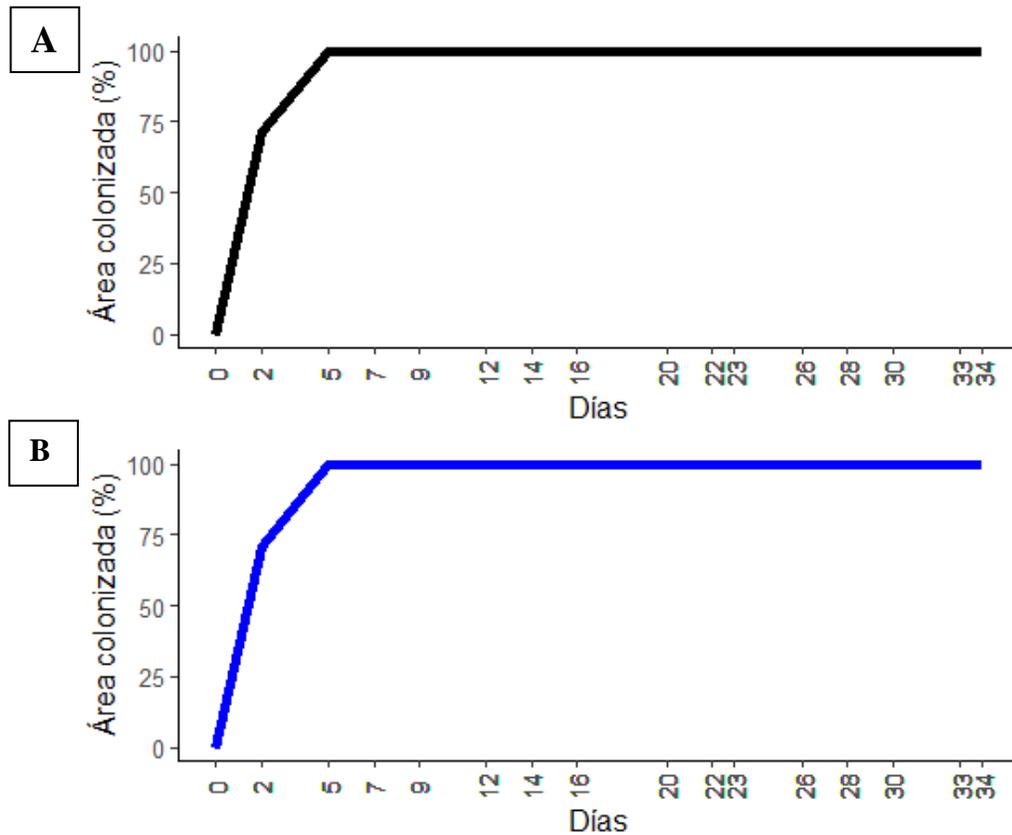


**Figura 8.** Textura del micelio de *Pleurotus ostreatus* en el último día de crecimiento del biofiltro, antes del secado en el horno (micelio vivo) y posterior al secado en el horno (micelio

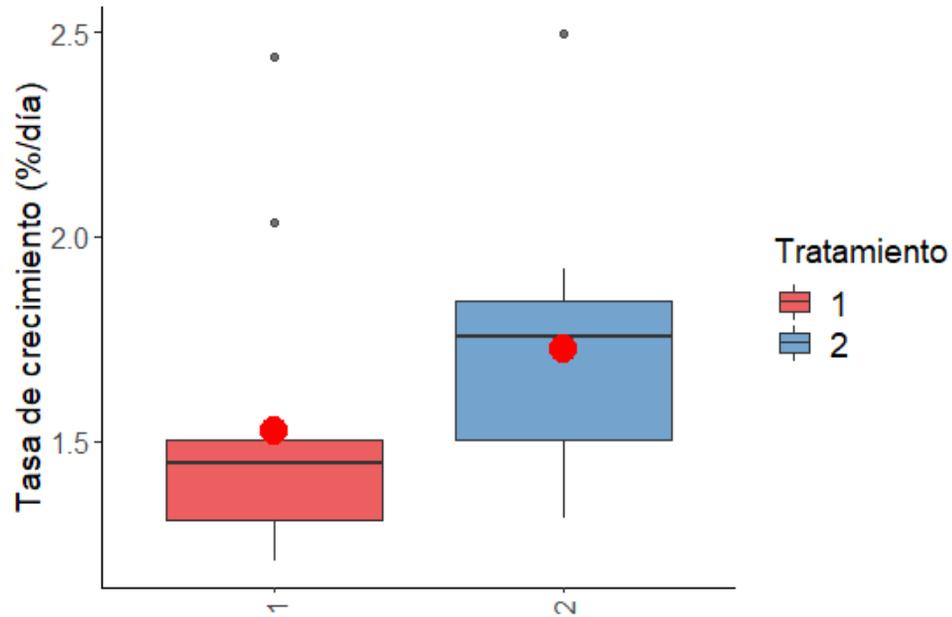
seco) durante 24 horas a 60°C. Las imágenes de la parte superior corresponden a la cara superior del biofiltro y las inferiores a la cara inferior del biofiltro.

## 7.2. Crecimiento del micelio de *P. ostreatus*.

El crecimiento del micelio se estabilizó al quinto día en ambos tratamientos (Figura 9), con casi el 100% del micelio superficial cubriendo la cara superior e inferior del sustrato. Posterior al quinto día, el micelio siguió creciendo hasta alcanzar el 100% del área cubierta por micelio. El crecimiento del micelio por día según la tasa de crecimiento es similar en los dos tratamientos (Figura 10;  $U=40$ ,  $p=0.06836$ ). Y la variabilidad de los datos para este crecimiento entre los dos tratamientos no es diferente (Figura 10;  $F=0.0309$ ,  $p=0.8622$ ), mostrando que el crecimiento del micelio es muy similar entre las réplicas de cada tratamiento.

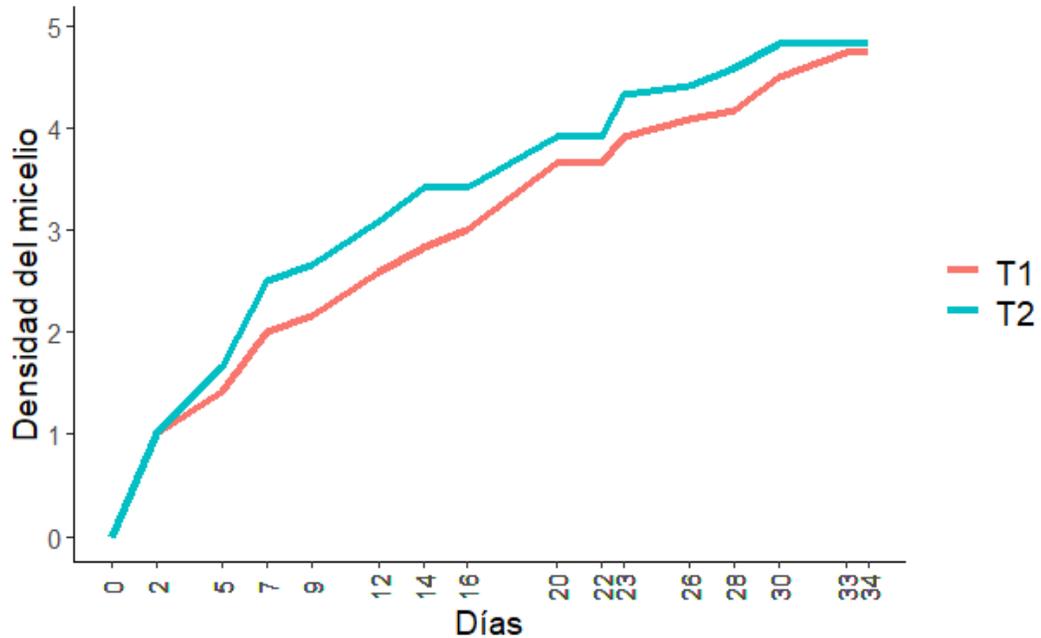


**Figura 9.** Curva de crecimiento del micelio de *Pleurotus ostreatus* sobre el heno (*Digitaria eriantha*) en un período de 34 días, para un total de 16 mediciones en lapsos de dos o tres días. A: Tratamiento 1 (T1, peso húmedo 260g), B: Tratamiento 2 (T2, peso húmedo 455g).

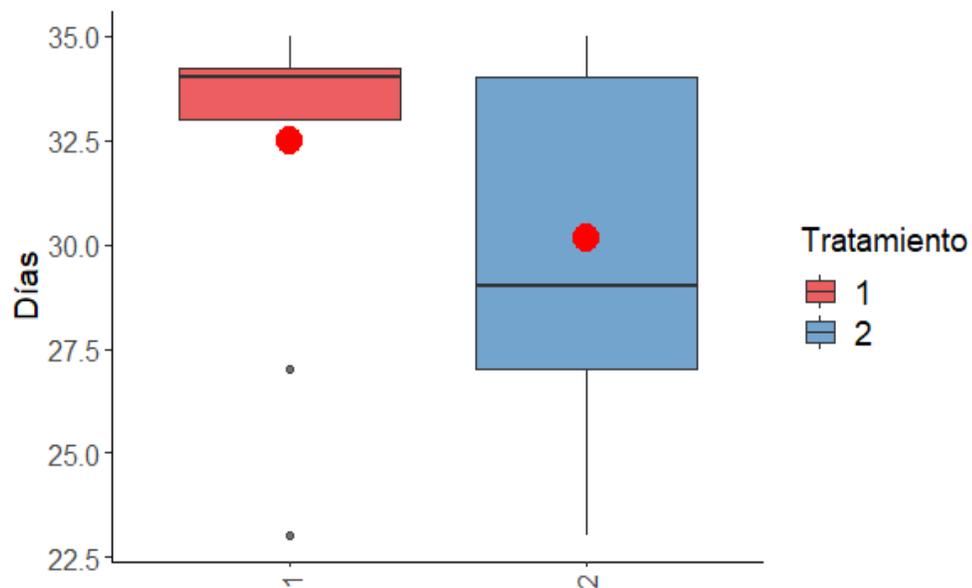


**Figura 10.** Tasa de crecimiento (% / Día) del micelio de *Pleurotus ostreatus* durante los 34 días de crecimiento para Tratamiento 1 (T1, peso húmedo 260g) y Tratamiento 2 (T2, peso húmedo 455g). El punto rojo muestra la media para cada tratamiento.

La tasa de crecimiento del micelio fue igual para ambos tratamientos, no así el tiempo necesario para alcanzar la densidad de micelio deseada, donde, para el T2(Figura 11) fue en promedio el día 30 que la mayoría de las réplicas alcanzaron el nivel cinco de densidad (Densidad v). Por otro lado, el T1(Figura 11) lo alcanzó hasta el día 32. El tiempo final de crecimiento del micelio, el día cuando se alcanzó la densidad cinco (Densidad v), fue similar en ambos tratamientos (Figura 12;  $U = 94.5$ ,  $p = 0.1961$ ). Y la variabilidad entre los días de los tiempos finales de crecimiento en cada tratamiento fue similar, cada réplica terminó su crecimiento en días similares (Figura 12;  $F = 0.9277$ ,  $p = 0.3459$ ).



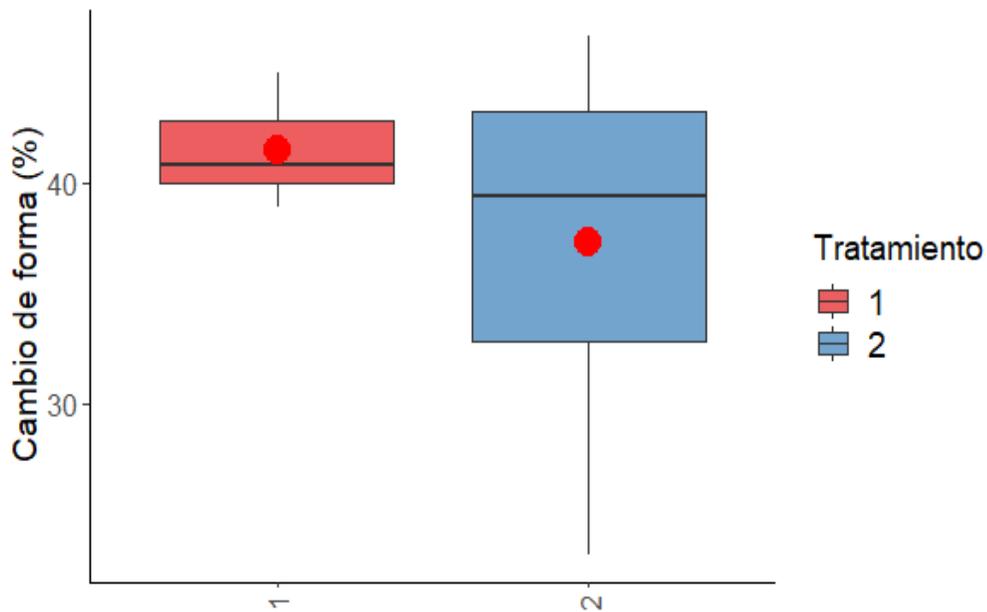
**Figura 11.** Cambio en la densidad cualitativa del micelio de *Pleurotus Ostreatus* durante 34 días de crecimiento sobre heno (*Digitaria eriantha*), para un total de 16 mediciones en lapsos de dos o tres días. Tratamiento 1 (T1, peso húmedo 260g) y Tratamiento 2 (T2, peso húmedo 455g).



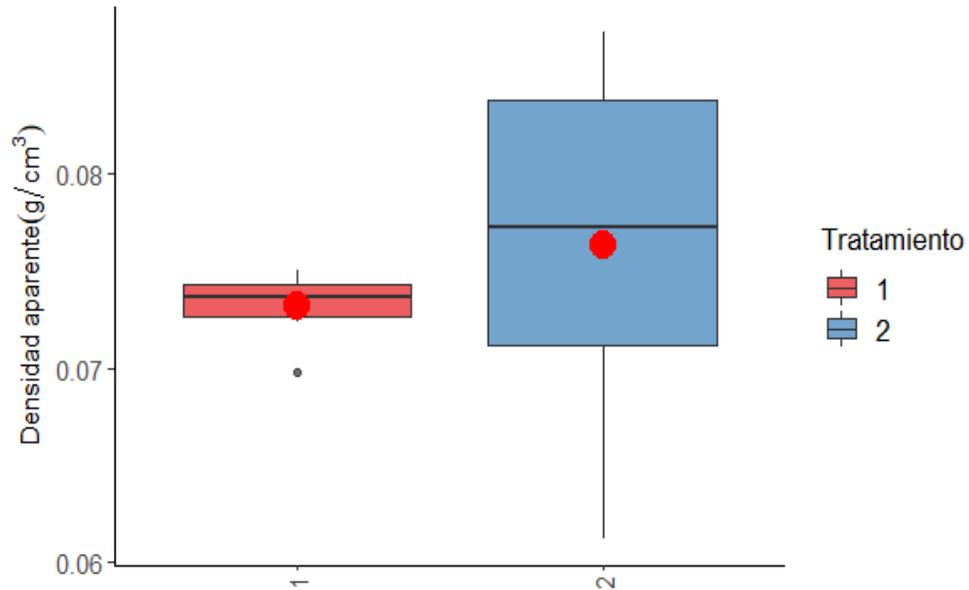
**Figura 12.** Tiempo final (días) de crecimiento del micelio de *Pleurotus ostreatus* sobre el heno (*Digitaria eriantha*), para Tratamiento 1 (T1, peso húmedo 260g) y Tratamiento 2 (T2, peso húmedo 455g). El punto rojo muestra la media para cada tratamiento.

### 7.3. Características físicas e hidráulicas del biofiltro.

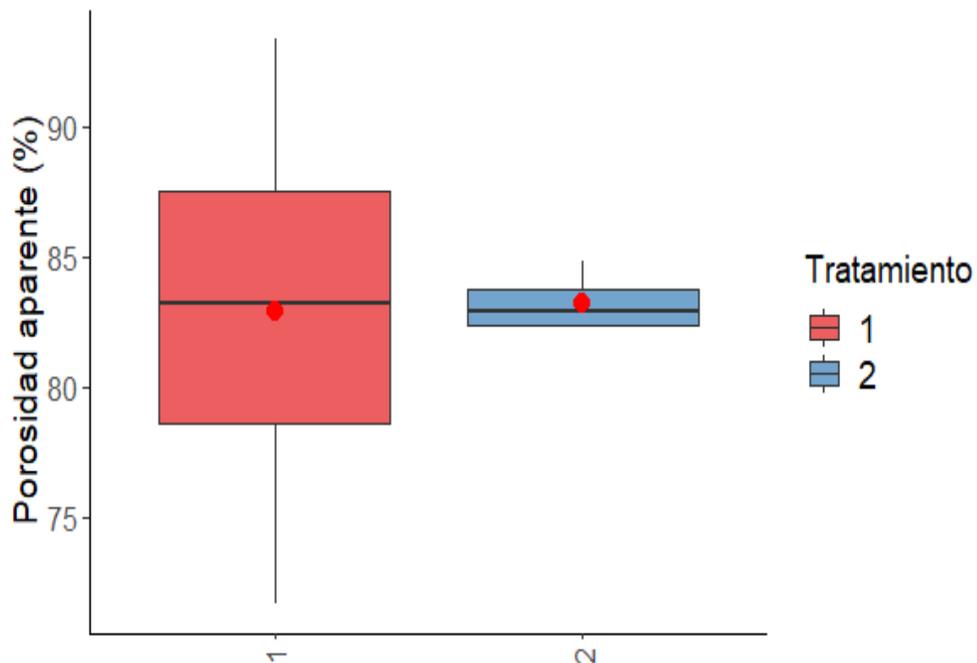
En ambos tratamientos el cambio de forma del biofiltro de acuerdo con el volumen es similar (Figura 13;  $U= 21$ ,  $p= 0.6889$ ), variando la forma en un 40% aproximadamente respecto al material húmedo antes del secado. Sin embargo, en el T2(Figura 13) se observa una mayor variabilidad en los datos ( $F= 5.2244$ ,  $p= 0.04535$ ), siendo menos preciso, pero con algunos porcentajes menores al 40%. En cuanto a la densidad aparente del biofiltro, ambos tienen una densidad similar (Figura 14;  $t= 0.7799$ ,  $df= 5.3722$ ,  $p= 0.4684$ ), pero la variabilidad de los datos de las réplicas es mayor para el T2(Figura 14;  $F= 7.9813$ ,  $P= 0.018$ ). La porosidad aparente del biofiltro en ambos tratamientos es muy cercana y no hay diferencia al compararlas (Figura 15;  $t= 0.076062$ ,  $df= 3.0994$ ,  $p= 0.944$ ). También, la variabilidad entre los porcentajes de porosidad aparente entre réplicas de cada tratamiento es similar (Figura 15,  $F= 5.2153$ ,  $P= 0.06248$ ).



**Figura 13.** Porcentaje del cambio de forma, en volumen, del biofiltro después del secado en horno a 60°C por 24 horas, para Tratamiento 1 (T1, peso húmedo 260g) y Tratamiento 2 (T2, peso húmedo 455g). El punto rojo muestra la media para cada tratamiento.



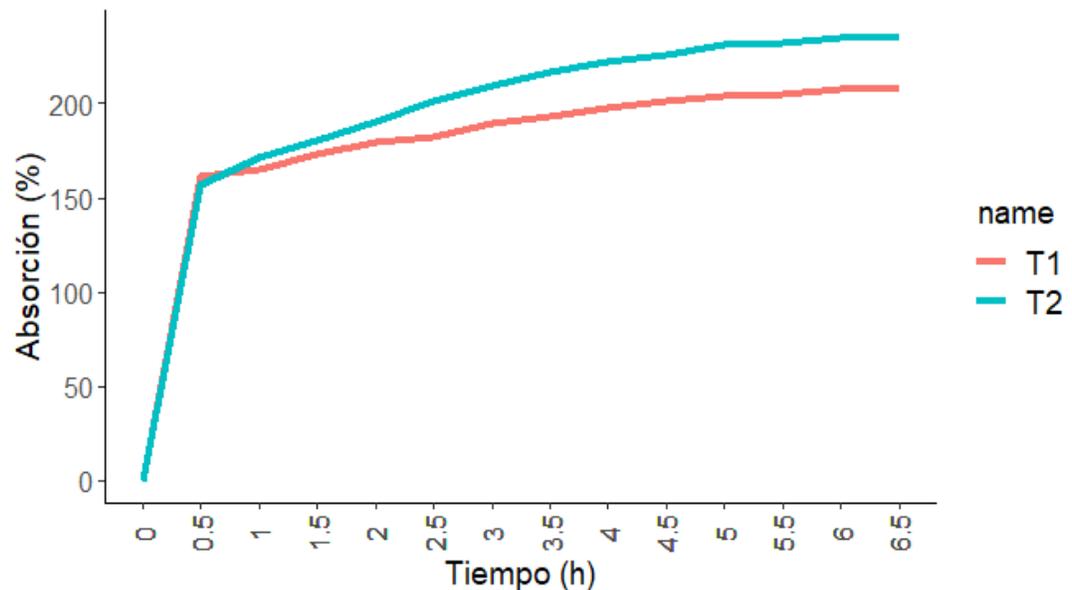
**Figura 14.** Densidad aparente ( $\text{g/cm}^3$ ) del biofiltro posterior al secado en horno a  $60^\circ\text{C}$  por 24 horas, para Tratamiento 1 (T1, peso húmedo 260g) y Tratamiento 2 (T2, peso húmedo 455g). El punto rojo muestra la media para cada tratamiento.



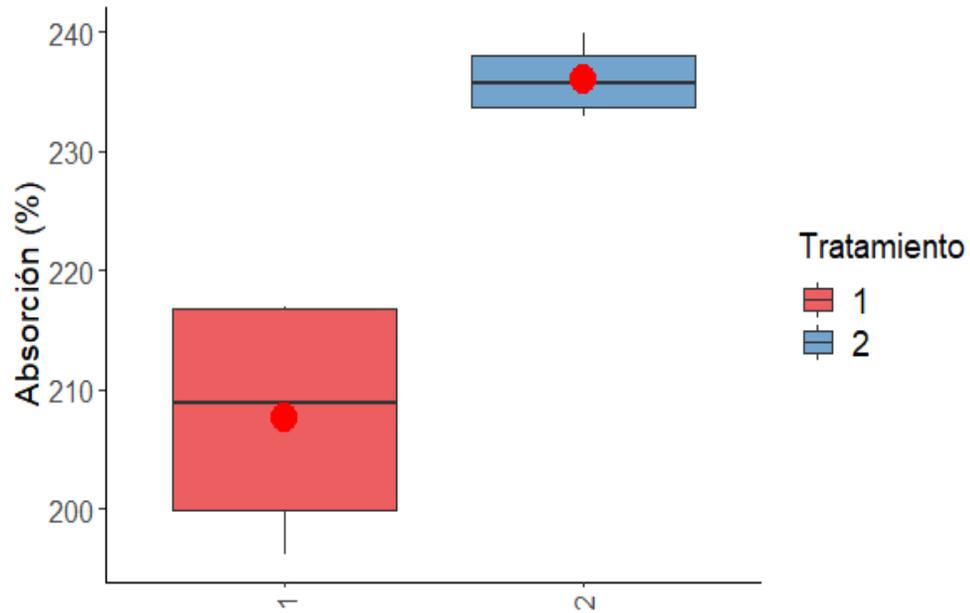
**Figura 15.** Porosidad aparente (%) del biofiltro a partir de los pesos del material (el peso húmedo, el peso seco y el peso saturado medido en la prueba de absorción de agua), para

Tratamiento 1 (T1, peso húmedo 260g) y Tratamiento 2 (T2, peso húmedo 455g). El punto rojo muestra la media para cada tratamiento.

La absorción de agua por parte del biofiltro fue rápida y tuvo un pico hasta los 30 minutos (0.5 horas, Figura 16). Posterior a este tiempo, el biofiltro continuó absorbiendo agua, pero en menor cantidad, hasta que se estabilizó en un tiempo de saturación cercano a las 5.5 horas. El porcentaje de absorción de agua del biofiltro, entre ambos tratamientos, al finalizar las 6.5 horas fue diferente (Figura 17;  $t = 5.0618$ ,  $df = 3.526$ ,  $p = 0.00996$ ). El biofiltro del T2 absorbe más cantidad de agua, aproximadamente 236% de su peso seco, comparado al T1 que absorbe aproximadamente 208% de su peso seco. Además, el T1 tuvo una mayor variabilidad en los datos obtenidos (Figura 17;  $F = 23.027$   $p = 0.003005$ ), siendo el T2 más constante en la cantidad de mL absorbidos en cada réplica.

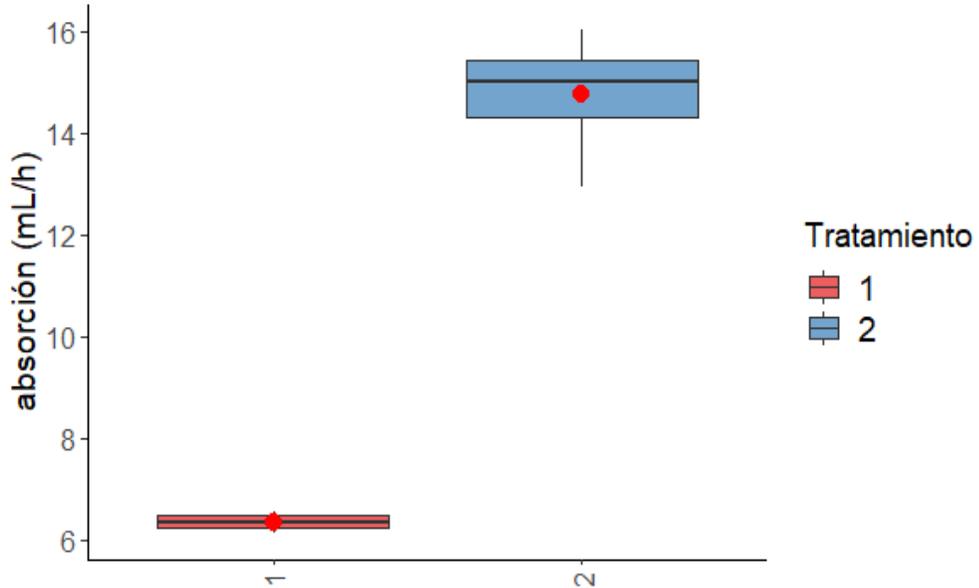


**Figura 16.** Curva del porcentaje de absorción de agua por parte del biofiltro seco hasta estabilizar el peso a las 6.5 horas, para un total de 14 mediciones en lapsos de cada media hora. Tratamiento 1 (T1, peso húmedo 260g) y Tratamiento 2 (T2, peso húmedo 455g).

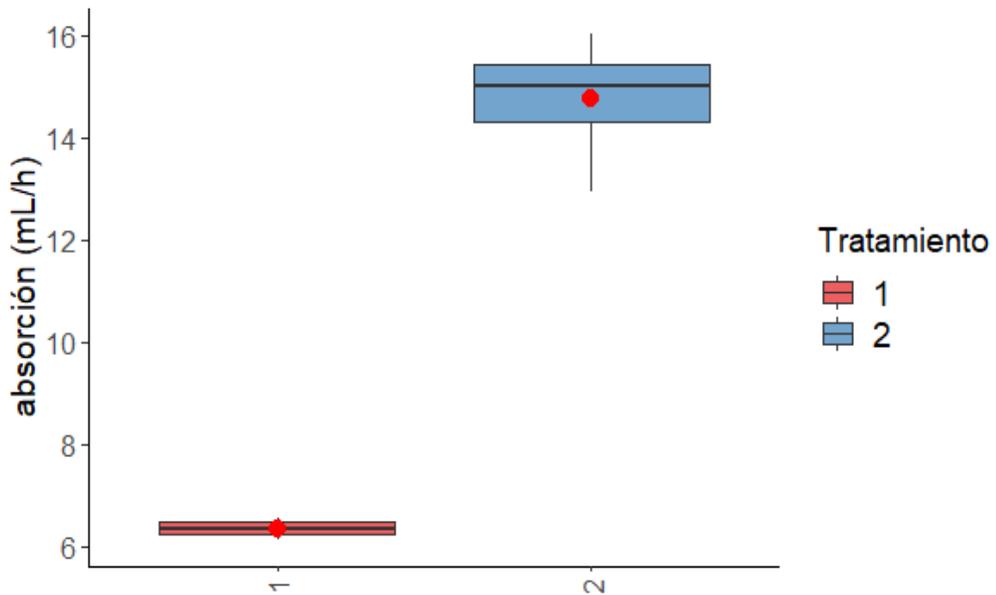


**Figura 17.** Porcentaje final de absorción de agua del biofiltro al finalizar las 6.5 horas de mantenerse sumergido. Para Tratamiento 1 (T1, peso húmedo 260g) y Tratamiento 2 (T2, peso húmedo 455g). El punto rojo muestra la media para cada tratamiento.

El T2 tuvo una mayor tasa de absorción durante las 6.5 horas del experimento (Figura 18;  $U=0$   $p=0.0285$ ). Y la variabilidad de los datos es similar entre ambos tratamientos (Figura 18;  $F=2.9606$   $p=0.1361$ ), siendo constante la cantidad de mL que fueron absorbidos por hora entre cada réplica. Similar a la absorción de agua por hora, el T2 obtuvo una mayor capacidad de absorción de agua; cada gramo de este biofiltro absorbió una mayor cantidad de agua comparado al T1 (Figura 19;  $t=5.0618$ ,  $df=3.526$ ,  $p=0.00996$ ). En el T1 la absorción de agua por gramo no es tan constante entre las réplicas, siendo más variable que el T2 (Figura 19;  $F=23.027$ ,  $P=0.003005$ ).



**Figura 18.** Tasa de absorción de agua por hora (mL/h) del biofiltro durante las 6.5 horas, para Tratamiento 1 (T1, peso húmedo 260g) y Tratamiento 2 (T2, peso húmedo 455g). El punto rojo muestra la media para cada tratamiento.



**Figura 19.** Cantidad de agua absorbida por gramo (mL/g) de biofiltro al finalizar las 6.5 horas de sumergido, para Tratamiento 1 (T1, peso húmedo 260g) y Tratamiento 2 (T2, peso húmedo 455g). El punto rojo muestra la media para cada tratamiento.

#### 7.4. Parámetros analizados del agua con As y el biofiltro durante el funcionamiento en el sistema de biosorción.

La concentración inicial de As en el agua obtenida a partir del análisis (10,48 µg/L) fue menor a la originalmente planeada para el experimento (100 µg/L). Adicionalmente, la concentración final de As en el agua fue mayor a la concentración inicial (Tabla 1), lo que llevó a una eficiencia de biosorción negativa, indicando que el agua estaría ganando iones de As (Tabla 1). El análisis de concentración de As en los biofiltros de ambos tratamientos, posterior al uso en el SB, arrojó que las concentraciones de As fueron mayores a las del As en el agua (inicial o final, Tabla 2). Debido a los resultados obtenidos, se analizó la concentración de As en el heno y se determinó que el heno usado para la realización del biofiltro poseía As *a priori* (Tabla 2). El pH del agua fue muy similar en ambos tratamientos, antes y después del filtrado, y el DQO en cada tratamiento aumentó en gran cantidad después del filtrado (Tabla 1).

**Tabla 1.** Parámetros medidos en el agua antes y después de iniciar el tratamiento de adsorción con el biofiltro de *Pleurotus ostreatus* sobre heno (*Digitaria eriantha*). Tratamiento 1 (T1, peso húmedo 260g) y Tratamiento 2 (T2, peso húmedo 455g). (Para concentración final y eficiencia de biosorción se muestra la mediana del tratamiento).

Parámetro	Tratamiento 1	Tratamiento 2
Concentración inicial As (µg/L)	10,48±0,95	10,48±0,95
Concentración final As (µg/L)	11,97±0,95	12,29±0,95
Eficiencia de biosorción (%)	-14,22	-17,27
pH inicial	5,62±0,15	5,62±0,15
pH final	5,33±0,15	5,33±0,15
DQO inicial (mg/L)	0	0
DQO final (mg/L)	1346±71	1831±37

**Tabla 2.** Concentración de As en el biofiltro después del funcionamiento en el sistema de biosorción y de una muestra de heno sin micelio del hongo, sin colocarse en el sistema. (Para la concentración en los biofiltros se muestra la mediana del tratamiento).

	Concentración de As (µg Kg <sup>-1</sup> )
Tratamiento 1	Menor a 120
Tratamiento 2	Menor a 130
Muestra de heno	Menor 97

## 8. DISCUSIÓN.

### 8.1. Crecimiento del micelio de *P. ostreatus* en la creación del biofiltro y los dos tratamientos utilizados.

El micelio de *P. ostreatus* se ha observado que crece de manera rápida en diferentes tipos de paja o heno (Ghazvinian et al., 2019; Melanouri et al., 2022; Sainos et al., 2006). En cáscara de arroz el micelio de este hongo cubrió por completo el sustrato en ocho días, a tres temperaturas diferentes (20, 25 y 30°C); mientras que en bagazo de caña o serrín duro más (Nashiruddin et al., 2022). También se ha observado en otro experimento, que en tres días el micelio no denso colonizó por completo sustratos de caña o salvado de trigo, y que en otros sustratos a los doce días se completó la colonización (Joshi et al., 2020). En el presente estudio, para ambos tratamientos, fue en el quinto día donde el micelio casi colonizó la totalidad del sustrato, se asemeja a lo observado anteriormente, y contrario en paja donde en 11 días el micelio muestra poco crecimiento (Houette et al., 2022). Además del sustrato, hay otros factores que afectan la tasa o velocidad de crecimiento, como, por ejemplo, la cantidad de inóculo usado. Según Nashiruddin et al. (2022), utilizar una cantidad del 40% peso/peso de inóculo es el óptimo, porcentaje que es muy similar al 30% usado en este trabajo. Otros factores que pueden afectar son la heterogeneidad y compactación del sustrato; en sustratos más heterogéneos puede que el crecimiento sea más lento (Membrillo et al., 2011) y cuando el material está muy compactado, puede que reduzca la presencia de hifas del micelio (Appels et al., 2019). En ese sentido, el hecho de que, en los primeros días de crecimiento del material, los puntos de crecimiento del micelio aparecieron distribuidos por todo el material, demostró que el homogenizado al combinar el heno con la semilla del hongo dio buen resultado.

El tiempo de incubación o formación del micelio puede variar de acuerdo al tamaño del material, de la especie o cepa del hongo y del tipo o naturaleza del sustrato (Manan et al., 2021), donde, se podría reducir el tiempo optimizando condiciones o colocando un sustrato más apto (Gan et al., 2022). En la presente investigación, el tiempo final de crecimiento para ambos tratamientos se encuentra dentro de los rangos reportados en la literatura para la formación de otros materiales similares. Según Mohd et al. (2022) la duración promedio para completar totalmente un material a partir de micelio fúngico en un sustrato lignocelulolítico suele ser de

17 días , pero en otros estudios el tiempo observado varía entre cinco a 42 días, según el sustrato (Gan et al., 2022; Manan et al., 2021). Además del sustrato, otros factores como la cantidad de inóculo utilizado o problemas de contaminación posteriores al inóculo también pueden afectar el tiempo de crecimiento. Un aspecto por rescatar en la presente investigación fue la baja o nula contaminación del biofiltro o biomaterial por otros hongos, indicando que el protocolo utilizado en la formación del material y la toma de los datos permitió mantener una contaminación baja. Así también, se pudo deber al rápido crecimiento del micelio, donde este incrementa la tasa de penetración del sustrato colonizándolo rápidamente, reduciendo la competencia con otros organismos que pueden contaminar el material (Nashiruddin et al., 2022; Zharare et al., 2010).

Otro aspecto importante, son las características físicas del material obtenido. En este estudio, cuando se finalizó el tiempo de incubación, en ambos tratamientos se observó por la cara superior del bloque un micelio denso y blanco tipo algodonoso. Mientras que en la cara inferior se observó, posterior a desmoldarlo, un micelio más rígido tipo “piel”. Esto se ha observado para *P. ostreatus* en donde el micelio que no está en contacto con superficies, o micelio aéreo, forma un filme más denso y algodonoso, mientras que, el micelio creciendo más compacto es más rígido formando una “piel” (Appels et al., 2019; Escaleira et al., 2020). El cambio en la densidad del biofiltro a través de los días es más gradual comparado al crecimiento del micelio; donde, en los primeros días, la densidad del micelio era menor siendo más transparente, esto también debido a una menor biomasa de micelio. En otros estudios se ha observado que el micelio de *P. ostreatus* iniciando la colonización fue más plano y no tan grueso, pero, alrededor de los 20 días aumenta su densidad, formando una estructura del micelio más compacta y porosa (Haneef et al., 2017). El tipo de sustrato es un factor principal en la formación o no formación de micelio más denso, mostrando mayor densidad en sustratos con más celulosa (Haneef et al., 2017).

## **8.2. Características físicas e hidráulicas del biofiltro.**

Una vez el material o biofiltro se formó en el molde, para ambos tratamientos, no se observó un cambio en la forma o dimensiones, manteniendo siempre las dimensiones originales. Una vez el biofiltro fue secado, si ocurrió un cambio en la forma y el volumen del material, afectando principalmente la altura del bloque. Hay varios autores que atribuyen estos cambios al hecho de que las hifas pierden la presión hidrostática, pierden agua, y se vuelven más planas;

y de igual manera todo el material pierde agua por evaporación (Elsacker et al., 2019; Nashiruddin et al., 2022). Además, el hecho de que el mayor cambio se observó en la altura del bloque se pudo deber a que la cara superior del bloque, al no estar en contacto con una superficie, produjo un micelio más algodonoso, el cual se ve más afectado por el secado. Se ha observado, que un factor limitante de la reducción de tamaño es la fricción que se crea entre el material y las paredes del molde, esto cuando el material se seca en el mismo molde (Houette et al., 2022), por lo que las propiedades del molde pueden afectar la topología de la superficie del material (Attias et al., 2020). Varios estudios han reportado que el promedio de disminución en el tamaño del material, posterior al secado, puede rondar entre 5-40% (Elsacker et al., 2019; Houette et al., 2022; Vašatko et al., 2022). El cambio de forma observado en el biofiltro en este estudio, para ambos tratamientos, fue de alrededor del 40%, el máximo reportado en la literatura. Este cambio de forma podría ocasionar problemas en materiales que ocupan un tamaño determinado y de ahí la importancia de tomar en cuenta este aspecto, de acuerdo con el uso que se le quiera dar al material.

La densidad es un factor importante que afecta o se relaciona a las propiedades mecánicas e hidráulicas del material (L. Yang et al., 2021). Generalmente, la densidad depende del tipo de sustrato usado, de la compactación del sustrato o del tamaño de partícula empleado en el sustrato (Elsacker et al., 2019; Houette et al., 2022; Membrillo et al., 2011; Nashiruddin et al., 2022). En estudios recientes en los que se analizaron varios materiales, variando la especie de hongo, variando el sustrato, y variando factores como el tamaño de partícula o compactación, se observaron densidades tales como  $0.26 \text{ g/cm}^3$  (Vašatko et al., 2022),  $0.286 - 0.409 \text{ g/cm}^3$  (Nashiruddin et al., 2022),  $0.10 - 0.39 \text{ g/cm}^3$  (Appels et al., 2019),  $0.0658 - 0.159 \text{ g/cm}^3$  (Elsacker et al., 2019). En otro estudio, un material hecho a partir del micelio del hongo *T. versicolor* y utilizando cáñamo como sustrato presentó una densidad que rondó los  $0.0721-0.0886 \text{ g/cm}^3$  mientras que con residuos de linaza fue de  $0.0598-0.0685 \text{ g/cm}^3$  y con heno que fue entre  $0.0944-0.122 \text{ g/cm}^3$  (Elsacker et al., 2019). Para un material con *P. ostreatus*, con sustrato de serrín de pino, la densidad rondó los  $0.06 \text{ g/cm}^3$  (Escaleira et al., 2020). El biofiltro del presente estudio presentó densidades en el rango de  $0.061 \text{ g/cm}^3$  a  $0.087 \text{ g/cm}^3$ , lo que se podría considerar como una densidad baja. En ocasiones estos materiales se comparan o se clasifican dentro de espumas tipo poliestireno expandido, pero poseen una mayor densidad; en el caso del poliestireno la densidad puede rondar entre  $0.022-0.03 \text{ g/cm}^3$  (Girometta et al., 2019;

Gou et al., 2021; Joshi et al., 2020; Sivaprasad et al., 2021). En este caso, el material de estudio tuvo densidades mayores al poliestireno expandido. Y se observó que el T2 es más variable, lo que podría afectar en materiales donde se necesitan densidades definidas.

En cuanto el efecto del sustrato en la densidad del material final, el uso de heno ha demostrado que puede generar materiales menos densos comparados al uso de serrín (Ghazvinian et al., 2019). En ocasiones, las densidades bajas como las observadas en el biofiltro o material del presente estudio, pueden indicar que el crecimiento del micelio fue bueno y creció por bastante tiempo degradando el sustrato (Gan et al., 2022; Ghazvinian et al., 2019). Es importante mencionar, que la densidad puede modificarse antes o después de realizar el material, dependiendo del uso que se le vaya a dar a éste. El estudio de Houette et al. (2022) demostró que, con la aplicación de presión y calor, para compactar el material, se pudo incrementar la densidad en un 48%. Otro aspecto importante es la cantidad de sustrato, ya que, cuando en el sustrato la cantidad de partículas es alta, la densidad es mayor, mientras que, cuando se aumenta la cantidad de fibras se disminuye la densidad (Butu et al., 2020; Girometta et al., 2019). Por último, también se ha observado que la densidad depende de la porosidad del material, donde, a mayor porosidad hay menor densidad (Butu et al., 2020; Girometta et al., 2019). Al comparar la porosidad obtenida en el biofiltro (entre 71.63% a 93.36%), esta es mucho mayor a otras reportadas para *P. ostreatus* utilizando otros sustratos como paja de trigo o paja de cebada junto con avena, que fueron de 42.50% y 40.50%, respectivamente (Melanouri et al., 2022). Por lo que, el hecho de que el material de esta tesis presentara alta porosidad se considera un factor asociado con la baja densidad de este.

A pesar de que *P. ostreatus* posea características hidrofóbicas, que hacen que repela el agua, el micelio fúngico puede absorber agua lo mismo que el sustrato empleado (Joshi et al., 2020; Vašatko et al., 2022). Por ejemplo, solamente el micelio puede absorber una gota de agua en 15 minutos (Gan et al., 2022), pero la absorción en conjunto con el sustrato también depende de la porosidad y la superficie del material (Antinori et al., 2020; Joshi et al., 2020). Se ha observado que en los primeros 30 minutos la absorción de agua es alta y luego se vuelve más estable, para muestras con sustrato de paja o cáñamo la absorción es más rápida y alcanza el límite más rápido (Elsacker et al., 2019). Lo anterior es similar al tiempo de absorción observado para ambos tratamientos de este estudio. Los porcentajes de absorción pueden variar bastante

dependiendo del sustrato. Por ejemplo, en un material de *P. ostreatus* con serrín como sustrato, el porcentaje de absorción fue de 120-185% (Sivaprasad et al., 2021), con serrín y bagazo de caña fue de 131-237% (Joshi et al., 2020) y con sustrato de paja de arroz fue de 122-148% (Lee & Choi, 2021). El biofiltro producido aquí, presentó porcentajes de absorción de entre 140% a 331%, que son mayores que a la mayoría. Aunque el T1 tiene porcentajes más bajos que el T2, de igual manera la absorción de agua se consideró alta.

Durante y al finalizar las seis horas de análisis de la prueba de absorción de agua, el biofiltro conservó su forma y quedó flotando, a pesar de que el material absorbió agua entre 140% a 331% de su peso seco. Que el biofiltro quedara flotando en el agua, después de absorber agua, pudo deberse a que, cuando el micelio se deshidrató algunas células colapsan y se sellan guardando aire, quedando atrapado. El agua pudo absorberse en algunas células pero a estas con aire atrapado no se absorbe, por lo que estas células con aire pudieron generar que el material flote (Attias et al., 2020). También que el biofiltro conserve su forma es una característica deseable para materiales basados en micelio (Joshi et al., 2020). Las características hidráulicas tales como el porcentaje de absorción de agua y la cantidad de agua absorbida por gramo del biofiltro, si fueron diferentes al comparar los bloques producidos con ambos tratamientos, siendo el T2 el que obtuvo mejores características; esto pudo deberse directamente al efecto de la cantidad de masa disponible para la absorción

Los materiales con menor densidad, y por lo tanto una mayor porosidad, suelen ser los que poseen una mayor absorción de agua (Antinori et al., 2020; Attias et al., 2020). La porosidad del sustrato está relacionada directamente a la capacidad de absorción de agua (Dias et al., 2021; Lee & Choi, 2021), ya que la alta porosidad puede generar más área disponible para absorción (Joshi et al., 2020). Asociado a esto, también se encuentra la tasa de crecimiento del micelio, porque a mayor crecimiento del micelio, hay mayor degradación del sustrato, resultando en mayor porosidad y permeabilidad del material (Gou et al., 2021). Por lo tanto, para el biofiltro producido aquí, a pesar de las diferencias en absorción entre los tratamientos, la porosidad fue alta en ambos y por consiguiente, el porcentaje de absorción de agua fue alto. Estas características como la absorción de agua, la cual va de la mano con la alta porosidad obtenida, además de que el biofiltro conserva la forma, es importante para este estudio dentro del SB. Ya que, en materiales empleados dentro de procesos de absorción, cuando existe porosidad se

incrementa la biosorción, debido a que hay más sitios activos o área superficial (Jin et al., 2018). Y similar a lo anterior sucede en los materiales a base de micelio, la absorción de agua aumenta cuando existe mayor porosidad (Lee & Choi, 2021), por lo que, estas dos variables estarán relacionadas y se pudo inferir que el biofiltro, al tener alta absorción de agua también dada por la alta porosidad, lo hace importante como material de estudio en procesos de biosorción.

### **8.3. Parámetros analizados del agua con As y el biofiltro durante el funcionamiento en el sistema de biosorción.**

La biosorción de arsénico no se pudo comprobar debido a que la concentración del biofiltro fue mayor a la presente en el agua. También, la concentración de As en el agua fue menor a la calculada, esto pudo ser debido a pérdida de pureza del reactivo, ya que fue abierto mucho tiempo atrás. Sin embargo, a pesar de que no se pudo analizar la biosorción, se observó un aumento de concentración de As en el agua, lo que plantea que hay un balance de masas. Donde, el As presente en el biofiltro pasó al agua, debido a que la concentración en el biofiltro es casi 10 veces mayor. A este proceso se le conoce como desorción y se observa que, cuando un material alcanza su adsorción máxima o equilibrio, los iones de As pueden desprenderse de la superficie del material y volver a la solución acuosa (Kamsonlian et al., 2012; Shakoor et al., 2018; Tajernia et al., 2014). En este caso no se puede asegurar que el material estaba en equilibrio o se encontraba en el máximo de adsorción, pero, si se observa el paso de los iones del biofiltro hacia el agua.

Que el biofiltro presentó una mayor concentración de As comparada a la concentración inicial en el agua, generó una serie de hipótesis. Donde, se descartó la presencia de As en el micelio del hongo, ya que este creció en ambientes controlados desde su adquisición y, por lo tanto, el heno pudo causar la presencia de As. Para esto, después del análisis de una muestra de heno, se encontró que el sustrato empleado en el estudio contenía As. Para *D. eriantha* no se encontró información de concentraciones o adsorción de As para la planta viva. Sin embargo, en otros pastos se ha observado que es posible el crecimiento de la planta sobre suelos con altas concentraciones de As, y que además, la planta adsorbió este metaloide (Machlis, 1941; Sultana & Katsuichiro, 2011; Tsvetkova et al., 2012; Zacarías et al., 2012). El As se pudo encontrar en todas las partes de la planta, pero generalmente en la raíz es donde se acumula una mayor concentración; también en partes aéreas se puede encontrar en las hojas y en los nudos de la

planta (Machlis, 1941; Sekhar et al., 2003; Sultana & Katsuichiro, 2011; F. Yang et al., 2018; Zolnowski et al., 2010). Las muestras del biofiltro contenían una menor concentración de As comparada a los 210  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  permitido para pastos (Tsvetkova et al., 2012). La presencia del As en el heno del biofiltro se pudo originar durante el cultivo del pasto; el As puede ser absorbido del suelo, pero la capacidad de absorción por parte de la planta varía según la especie (Sekhar et al., 2003; F. Yang et al., 2018; Zolnowski et al., 2010).

Un factor que en futuros usos del biofiltro puede afectar a la calidad del agua se trata de la cantidad de materia orgánica presente después de emplear el biofiltro. Un parámetro que se utiliza para estimar de manera indirecta la cantidad de materia orgánica, se trata de la demanda química de oxígeno (DQO), midiendo el estimado de la cantidad de oxígeno susceptible a la oxidación (Iliná et al., 2009; J. Li et al., 2018; Sarda & Sadgir, 2015). Para este estudio el DQO indicó si del biofiltro se liberaron compuestos o materia orgánica durante su uso en el SB. Se demostró que existe liberación por parte del biofiltro, debido a los altos valores del DQO y también que se observó el agua de color pardo amarillento cuando se finalizaron las 6 horas de análisis en el SB. Esta coloración pudiendo ser taninos presentes en el heno. En este estudio se sigue liberando gran cantidad de compuestos orgánicos del biofiltro, a pesar de que se realizaron varios lavados al sustrato, antes de inocular con el hongo. Y a pesar de que se ha observado que el lavado de los materiales lignocelulosos con agua previene en gran manera la liberación de compuestos orgánicos (Šćiban et al., 2008). Al comparar la concentración de DQO, esta es mucho mayor a la observada en otros materiales adsorbentes formados con diferentes tipos de paja, aunque, se acerca a los valores de concentración aproximados a los 1200 mg/L, observados en adsorbentes realizados con elote o tallo de maíz (Šćiban et al., 2008). Para cáscara de maracuyá los valores más altos se pudieron observar cercano a los 900 mg/L (Iliná et al., 2009), considerándose un aumento significativo y en este estudio se sobrepasó este valor. Comparado contra el valor permitido de 10 mg/L de DQO en agua potable (Gupta et al., 2009; Sarda & Sadgir, 2015), el biofiltro aumenta significativamente la cantidad de materia orgánica en el agua. Por lo tanto, controlar el DQO, previamente o posterior al filtrado, es esencial para reducir o evitar la liberación de compuestos orgánicos y que el agua pueda ser usada para consumo o utilización por humanos.

Al analizar las razones de la presencia de As en el heno, se especula que posiblemente el suelo donde se cultivó heno contenía As o se regaron las plantas con agua que contenía As. Un resultado de estos inevitablemente genera la duda del riesgo que puede presentar la presencia de este As dentro de la cadena alimenticia. Por ejemplo, en la leche de vacas alimentadas con este heno, se podrían presentar altos niveles de As y siendo un camino para la contaminación en los humanos (Sekhar et al., 2003). Por lo que esto también eleva la preocupación de analizar más en profundidad el ciclo del As en estos casos.

En el caso del crecimiento de *P. ostreatus* sobre el heno, se ha observado que este puede crecer en sustratos contaminados con As y acumular en sus células este metaloide (De et al., 2021; Mleczek et al., 2016; Zoysa et al., 2020). Se ha observado que la acumulación de As afecta el crecimiento del hongo, baja la biomasa de los cuerpos fructíferos, aumenta el tiempo de colonización total y aumenta la tasa de crecimiento del micelio (Zoysa et al., 2020), y en términos nutricionales también se ha observado que baja el contenido de proteínas (De et al., 2021). Sin embargo, estos efectos han sido observados para concentraciones mucho más altas que las de este estudio. Por lo que, observando las características de crecimiento del micelio en este estudio, y comparando contra los estudios anteriores, a manera de observación, se podría inferir que el micelio no se vio afectado por la presencia de As en el heno, pero si podría de igual manera acumular As; aunque esto tendría que ser analizado. Esta acumulación puede tener efectos tóxicos en los humanos si el hongo es consumido, donde en algunas ocasiones podría almacenar concentraciones altas, por lo que también en aplicaciones de consumo humano se debe procurar el elegir y analizar un sustrato sin contaminantes (De et al., 2021; Mleczek et al., 2016; Zoysa et al., 2020).

## 9. CONCLUSIÓN.

Comparado con otras investigaciones, tanto la tasa de crecimiento del micelio de *P. ostreatus*, como la densidad cualitativa del micelio y el tiempo final de crecimiento del micelio, coinciden con lo reportado en la literatura. La tasa de crecimiento del micelio se puede considerar que fue muy rápida. También la densidad cualitativa del micelio llegó a ser muy alta en todas las réplicas. Las características visuales observadas en el micelio del biofiltro concuerdan con otros materiales descritos en la literatura, donde el micelio es

algodonoso en contacto con el aire y en las otras caras que están en contacto directo con el molde es más grueso o con textura de “piel”. En este estudio se logró caracterizar el crecimiento del micelio, estandarizar el protocolo para la creación de un biomaterial a base de micelio fúngico y determinar los cuidados necesarios para evitar contaminaciones del material. Además, dado que las características de crecimiento y densidad son similares en ambos tratamientos, se puede inferir que en este caso la diferencia en masa no es un factor que afecte el crecimiento del micelio.

Una vez que el micelio creció en el sustrato y los bloques estuvieron listos, no se observó un cambio de forma sino hasta cuando se aplicó un choque térmico para secar el bloque. El cambio de forma en el biofiltro se dio por la deshidratación de las células. Este cambio de forma era de esperarse, ya que el sustrato no fue compactado. Para T2, con mayor masa, el cambio de forma del biofiltro no es tan consistente entre las réplicas, fue menos preciso, esto pudiendo ser un problema para materiales que sí ocupen un tamaño o forma determinada. En cuanto a la densidad aparente del biofiltro, ésta fue menor a otras reportadas, y cercana a la densidad promedio del poliestireno expandido; pudiéndose considerar, y de acuerdo con otros estudios, como un material tipo foam o con características similares. También pudiendo ser esta baja densidad un indicador de un alto crecimiento de micelio y una alta porosidad al degradar la mayoría del sustrato.

En cuanto a la capacidad de absorción de agua del biofiltro, se observó que, aunque el material flota y a pesar de poseer características hidrofóbicas, tanto el heno como el micelio son capaces de absorber agua. Lo que se demostró con el alto porcentaje de absorción de agua obtenido, en comparación con otros materiales dentro de la literatura. Cuando el biofiltro logra estabilizar su absorción y quedar en su capacidad máxima de absorción o tiempo de saturación, aún conserva su forma. La alta absorción de agua también indicó que la densidad es baja y por lo tanto la porosidad es alta, siendo un material más permeable, a pesar de la hidrofobicidad del hongo. Entre los dos tratamientos, solamente la capacidad de absorción de agua fue diferente, el resto de las características (crecimiento del micelio, densidad del micelio, cambio de forma del biofiltro, densidad del biofiltro y porosidad del biofiltro) siendo iguales independientemente de la masa. Con esto indicando que, cuando las demás características que pueden afectar la absorción de agua son similares

o se controlan, la masa es un factor determinante donde a mayor masa, como en el T2, mayor es la absorción de agua. Lográndose un biofiltro que se consideró idóneo para el uso como filtro de agua.

Cuando se colocó este biofiltro dentro del SB se lograron cuantificar algunos parámetros, aunque otros no fueron posibles de cuantificar debido al mismo metaloide analizado. Se realizan observaciones valiosas para tener en consideración y volver a realizar un estudio similar. Primeramente, el valor de DQO indicó que el uso de este material libera bastantes compuestos orgánicos en el agua, posiblemente por el uso del heno como sustrato, ya que el agua se tornó color pardo amarillento, a pesar de que se realizaron bastantes lavados al heno al inicio del experimento. Los resultados parecen indicar que se requieren más lavados o un proceso diferente. La eficiencia de biosorción de As no se pudo comprobar debido a que el biofiltro tenía concentraciones más altas de As que la presente en el agua. Pero, sí se observó una interacción de los iones de este metaloide debido a que la concentración final en el agua fue mayor a la inicial, esto pudiendo demostrar un efecto de desorción o liberación de iones desde el filtro hacia el agua, debido a un posible balance de masas.

Se descartó que el micelio o el inóculo del hongo previamente estuviese contaminado con As, debido a que posterior al experimento, al analizar una muestra del heno que fue usado, este poseía concentraciones de As más altas que el agua y similares a las del biofiltro. Por lo que se comprueba que el heno sí contiene As, sus concentraciones se podrían considerar no tan altas, pero esto genera y eleva la preocupación de la problemática del arsénico. Ya que para *D. eriantha* no se tiene información y al ser usado en muchas ocasiones como alimento en ganado se considera importante el conocer en más detalle si pudiese hallarse un efecto de toxicidad en animales y en un posible consumo por humanos. El hongo *P. ostreatus* puede almacenar As y su crecimiento puede verse afectado, pero esto se ha observado en concentraciones altas. Para este caso en estudio, al obtener buenas características de crecimiento del micelio, se observa que bajo esta concentración no se afecta *Pleurotus*. Las características logradas del material se pueden considerar factibles para un filtro, especialmente por su alta porosidad y absorción de agua. Y, además, por la

densidad aparente del biofiltro se podría considerar como un material tipo foam, con más pruebas, pudiéndose considerar su uso dentro de otras aplicaciones.

## 10. RECOMENDACIONES.

El crecimiento de *P. ostreatus* sobre el heno se pudo considerar como muy bueno siendo rápido y con buena densidad, formando un bloque de material con densidad similar al foam. Si el interés reside en realizar un material para aplicaciones similares al poliestireno expandido se recomienda el usar este protocolo acá estudiado, ya que se considera logró un material similar a otros observados en literatura. El protocolo permitió obtener una nula contaminación, un material a base de componentes que lo hacen económico y accesible para la realidad de Costa Rica o muchos países en el mundo que presenten a *D. eriantha* o sus variedades como pastos de forraje. Si se estudia como material para aplicaciones, fuera de un filtro, sería necesario realizar un análisis más exhaustivo de otras características físicas como pruebas de compresión, pruebas de flexión, pruebas termales e incluso acústicas. Además, se podría modificar el protocolo para realizar un material aplicando compresión al final de su crecimiento, para obtener otras características, pero manteniendo el buen crecimiento del micelio observado en este estudio.

En cuanto al sistema y pruebas de biosorción acá no se pudo comprobar su eficiencia, sin embargo, se conoce que *P. ostreatus* y pastos si tienen potencial de adsorción de metales pesados o metaloides. Por lo tanto, se considera que este mismo sistema y protocolo puede ser funcional modificando ciertas condiciones. El biofiltro o material realizado en el presente estudio posee alta porosidad y absorción de agua características deseables en sistemas de filtración. Se recomienda el asegurarse que el heno conseguido como sustrato no contenga arsénico u otros contaminantes que interfieran con la prueba, realizando pruebas anteriores a su uso. Posterior a realizar la prueba se puede analizar bajo el mismo sistema, ya que a pesar de que no se observó adsorción si se observó un movimiento de iones de As del filtro al agua. Otra situación observada es el alto DQO presentado probablemente por los taninos en el heno, por lo que se recomienda el encontrar y verificar algún cambio en el protocolo para eliminar la mayoría de los taninos o posterior al uso del filtro encontrar dentro del mismo sistema un método para eliminar compuestos orgánicos y bajar el DQO.

Para esto anterior al uso del heno se pueden realizar lavados más exhaustivos, lavar con peróxido de hidrógeno para eliminar coloraciones, pero no afectar otras características del heno. O posterior al uso en el sistema de biosorción el usar un segundo filtro físico, que no eleve el costo de operación, pero que elimine los compuestos orgánicos, pudiéndose aprovechar la eficiencia de eliminación de contaminantes. Otra consideración es la eliminación del biofiltro o material contaminado. Para esto se recomienda el encontrar métodos amigables con el ambiente para desechar el material. Se podrían realizar procesos de desorción para volver a obtener el contaminante y desechar correctamente sin afectar al ambiente de nuevo. Se podría además considerar el uso de estos materiales en aplicaciones de construcción para reforzar materiales y así secuestrando el contaminante dentro de muchos años sin ser regresado al suelo o agua. Se observó que este material posterior al uso en el sistema de biosorción no pierde su forma, por lo que se puede volver a secar y realizar pruebas físicas para caracterizar su posible uso dentro de otras aplicaciones. Teniendo en consideración una economía circular donde se aprovechen recursos de desecho para revalorizar su uso, aplicar en procesos de descontaminación y volver a regresar su uso en otras aplicaciones.

## 11. REFERENCIAS.

- Abdolali, A., Ngo, H. H., Guo, W., Lu, S., Chen, S., Nguyen, C. N., Zhang, X., Wang, J., & Wu, Y. (2016). A breakthrough biosorbent in removing heavy metals : Equilibrium , kinetic , thermodynamic and mechanism analyses in a lab-scale study. *Science of the Total Environment*, 542, 603–611. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.095>
- Akhtar, N., & Mannan, M. A. ul. (2020). Mycoremediation: Expunging environmental pollutants. In *Biotechnology Reports* (Vol. 26). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00452>
- Alemu, D., Tafesse, M., & Mondal, A. K. (2022). Mycelium-Based Composite : The Future Sustainable Biomaterial. *International Journal of Biomaterials*, 2022, 8401528.
- Ali, W., Rasool, A., Junaid, M., & Zhang, H. (2018). A comprehensive review on current status, mechanism, and possible sources of arsenic contamination in groundwater: a global perspective with prominence of Pakistan scenario. *Environmental Geochemistry and Health*, 41(2), 737–760. <https://doi.org/10.1007/s10653-018-0169-x>
- Álvarez-Cervantes, J., Sánchez, C., Díaz, R., & Díaz-Godínez, G. (2016). Characterization of production of laccases, cellulases and xylanases of *Pleurotus ostreatus* grown on Solid-State fermentation using an inert support. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 15(2), 323–331.
- Amen, R., Bashir, H., Bibi, I., Shaheen, S. M., Niazi, N. K., Shahid, M., Hussain, M. M., Antoniadis, V., Shakoor, M. B., Al-Solaimani, S. G., Wang, H., Bundschuh, J., & Rinklebe, J. (2020). A critical review on arsenic removal from water using biochar-based sorbents: The significance of modification and redox reactions. *Chemical Engineering Journal*, 396, 125195. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.125195>
- Amin, F., Talpur, F. N., Balouch, A., Ali, M. S., & Aqeel, M. B. (2015). Biosorption of fluoride from aqueous solution by white—rot fungus *Pleurotus eryngii* ATCC 90888. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 3, 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2014.11.003>
- Angelova, G. V, Brazkova, M. S., & Krastanov, A. I. (2021). Renewable mycelium based

composite – sustainable approach for lignocellulose waste recovery and alternative to synthetic materials – a review. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 76(11–12), 431–442.

- Antinori, M. E., Ceseracciu, L., Mancini, G., Heredia-guerrero, J. A., & Athanassiou, A. (2020). Fine-Tuning of Physicochemical Properties and Growth Dynamics of Mycelium-Based Materials. *ACS Applied Bio Materials*, 3(2), 1044–1051.  
<https://doi.org/10.1021/acsabm.9b01031>
- Appels, F. V. W., Camere, S., Montalti, M., Karana, E., Jansen, K. M. B., Dijksterhuis, J., Krijgsheld, P., & Wösten, H. A. B. (2019). Fabrication factors influencing mechanical, moisture- and water-related properties of mycelium-based composites. *Materials and Design*, 161, 64–71. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2018.11.027>
- Arias-Barrantes, B., Urbina-Campos, A., & Alvarado-Gómez, A. L. (2019). Determinación de As(III) y As(V) en los pozos de las plantas de remoción de arsénico de Costa Rica. *Revista Tecnología En Marcha*, 32(Iii), 147–157.  
<https://doi.org/10.18845/tm.v32i10.4888>
- Arifin, Y. H., & Yusuf, Y. (2013). Mycelium fibers as new resource for environmental sustainability. *Procedia Engineering*, 53, 504–508.  
<https://doi.org/10.1016/j.proeng.2013.02.065>
- Attias, N., Danai, O., Abitbol, T., Tarazi, E., Ezov, N., Pereman, I., & Grobman, Y. J. (2020). Mycelium bio-composites in industrial design and architecture: Comparative review and experimental analysis. *Journal of Cleaner Production*, 246, 119037.  
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119037>
- Attias, N., Danai, O., & Grobman, J. Y. (2017). *Developing novel applications of mycelium based bio-composite materials for design and architecture The Israeli Pavilion at the 15th Annual Venice Biennale for Architecture View project. September.*  
<https://www.researchgate.net/publication/319901570>
- Ayele, A., Haile, S., Alemu, D., Tesfaye, T., & Kamaraj, M. (2021). Mycoremediation: Fungal-Based Technology for Biosorption of Heavy Metals – A Review. In J. Aravind, M. Kamaraj, D. M. Prashanthi, & S. Rajakumar (Eds.), *Strategies and Tools for Pollutant*

- Mitigation* (pp. 355–373). Springer Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-63575-6\\_17](https://doi.org/10.1007/978-3-030-63575-6_17)
- Bánfi, R., Pohner, Z., Kovács, J., Luzics, S., Nagy, A., Dudás, M., Tanos, P., Márialigeti, K., & Vajna, B. (2015). Characterisation of the large-scale production process of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) with the analysis of succession and spatial heterogeneity of lignocellulolytic enzyme activities. *Fungal Biology*, *119*(12), 1354–1363. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.10.003>
- Barh, A., Kumari, B., Sharma, S., Kumar, S. A., Kumar, A., Kamal, S., & Parkash, V. S. (2019). Mushroom mycoremediation: Kinetics and mechanism. In P. Bhatt (Ed.), *Smart Bioremediation Technologies: Microbial Enzymes* (pp. 1–22). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818307-6.00001-9>
- Bhakta, J. N., & Ali, M. M. (2020). Biosorption of Arsenic: An Emerging Eco-technology of Arsenic Detoxification in Drinking Water. In A. Fares & S. K. Singh (Eds.), *Arsenic Water Resources Contamination Challenges and Solutions* (1st ed., pp. 207–230). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-21258-2\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-030-21258-2_9)
- Boddy, L., & Hiscox, J. (2016). Fungal Ecology : Principles and Mechanisms of Colonization and Competition by Saprotrophic Fungi. *Microbiol Spectrum*, *4*(6), FUNK-0019-2016.
- Boyle, D. (1998). Nutritional factors limiting the growth of *Lentinula edodes* and other White-rot fungi in wood. *Soil Biology and Biochemistry*, *30*(6), 817–823.
- Brauer, J. M., & Wolfson, M. M. (1986). The influence of different forms and concentrations of nitrogen on the growth and metabolism of *Digitaria eriantha* and *Chloris Gayana* grown under saline conditions. *Journal of the Grassland Society of Southern Africa*, *3*(3), 113–116. <https://doi.org/10.1080/02566702.1986.9648046>
- Bruneel, J., Huepe Follert, J. L., Laforce, B., Vincze, L., Van Langenhove, H., & Walgraeve, C. (2020). Dynamic performance of a fungal biofilter packed with perlite for the abatement of hexane polluted gas streams using SIFT-MS and packing characterization with advanced X-ray spectroscopy. *Chemosphere*, *253*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126684>
- Bugarski, D., Gvozdrenović, D., Červenski, J., & Takač, A. (2002). Effect of Major

- Environmental Conditions on the Development of the Mycelium and Growth of the Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Acta Horticulturae*, 579(579), 319–323.
- Butu, A., Rodino, S., Miu, B. A., & Butu, M. (2020). Mycelium-based materials for the ecodeign of bioeconomy. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 15(4), 1129–1140.
- Cárdenas-González, J. F., Acosta-Rodríguez, I., Téran-Figueroa, Y., & Rodríguez-Pérez, A. S. (2017). Bioremoval of arsenic (V) from aqueous solutions by chemically modified fungal biomass. *3 Biotech*, 7(3), 226. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0868-5>
- Cerdas, R., & Vallejos, E. (2012). Comportamiento productivo de varios pastos tropicales a diferentes edades de cosecha en Guanacaste, Costa Rica. *InterSedes*, 13(26), 6–22.
- Chang, B. V., Fan, S. N., Tsai, Y. C., Chung, Y. L., Tu, P. X., & Yang, C. W. (2018). Removal of emerging contaminants using spent mushroom compost. *Science of the Total Environment*, 634, 922–933. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.366>
- Chen, Z., Deng, H., Chen, C., Yang, Y., & Xu, H. (2014). Biosorption of malachite green from aqueous solutions by *Pleurotus ostreatus* using Taguchi method. *Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 12, 63.
- Cobos, O. F. H., Londoño, J. F. A., & Garcia, L. C. F. (2009). Design of a biofilter to reduce the contamination content by chromium generated in the industries of the leather tanning. *DYNA (Colombia)*, 76(160), 107–119.
- Collivignarelli, M. C., Damiani, S., & Sorlini, S. (2019). Comparison between experimental results of different technologies for arsenic removal from water intended for human consumption. *Water Practice and Technology*, 14(4), 884–896. <https://doi.org/10.2166/wpt.2019.073>
- De, A., Mridha, D., Bandopadhyay, B., Roychowdhury, T., & Panja, A. S. (2021). Arsenic and Its Effect on Nutritional Properties of Oyster Mushrooms with Reference to Health Risk Assessment. *Biological Trace Element Research*, 199, 1170–1178. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02224-6>
- Dias, P. P., Jayasinghe, L. B., & Waldmann, D. (2021). Investigation of Mycelium-

- Miscanthus composites as building insulation material. *Results in Materials*, 10, 100189. <https://doi.org/10.1016/j.rinma.2021.100189>
- Dubey, A., & Mishra, A. (2017). A Novel Plant-Based Biosorbent for Removal of Copper (II) from Aqueous Solutions : Biosorption of Copper (II) by Dried Plant Biomass. *Journal of Renewable Materials*, 5(1), 54–61. <https://doi.org/10.7569/JRM.2016.634127>
- Elisashvili, V., Kachlishvili, E., & Penninckx, M. (2008). Lignocellulolytic Enzymes Profile During Growth And Fruiting Of *Pleurotus ostreatus* On Wheat Straw And Tree Leaves. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 55(2), 157–168. <https://doi.org/10.1556/AMicr.55.2008.2.7>
- Elsacker, E., Vandeloock, S., Brancart, J., Peeters, E., & De Laet, L. (2019). Mechanical, physical and chemical characterisation of mycelium-based composites with different types of lignocellulosic substrates. *PLoS ONE*, 14(7), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213954>
- Escaleara, R. M., Campos, M. J., & Alves, M. L. (2020). Mycelium-Based Composites: A New Approach to Sustainable Materials. In H. Rodrigues, F. Gaspar, P. Fernandes, & A. Mateus (Eds.), *Sustainability and Automation in Smart Constructions* (pp. 261–266). Springer, Cham.
- Feofilova, E. P. (2010). The Fungal Cell Wall : Modern Concepts of its Composition and Biological Function. *Microbiology*, 79(6), 711–720. <https://doi.org/10.1134/S0026261710060019>
- Fernández-Fueyo, E., Ruiz-Dueñas, F. J., López-Lucendo, M. F., Pérez-Boada, M., Rencoret, J., Gutiérrez, A., Pisabarro, A. G., Ramírez, L., & Martínez, A. T. (2016). A secretomic view of woody and nonwoody lignocellulose degradation by *Pleurotus ostreatus*. *Biotechnology for Biofuels*, 9, 49. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0462-9>
- Fletcher, I., Freer, A., Ahmed, A., & Fitzgerald, P. (2019). Effect of Temperature and Growth Media on Mycelium Growth of *Pleurotus Ostreatus* and *Ganoderma Lucidum* Strains. *Cohesive Journal of Microbiology and Infectious Disease*, 2(5), CJMI.000549.2019. <https://doi.org/10.31031/CJMI.2019.02.000549>

- Ford, C. W. (1983). Effect of Particle Size and Delignification on the Rate of Digestion of Hemicellulose and Cellulose by Cellulase in Mature Pangola Grass Stems. *Australian Journal of Agricultural Research*, 34(3), 241–248.
- Gan, J. K., Soh, E., Saeidi, N., Javadian, A., & Hebel, D. E. (2022). Temporal characterization of biocycles of mycelium - bound composites made from bamboo and *Pleurotus ostreatus* for indoor usage. *Scientific Reports*, 12, 19362. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24070-3>
- García-Delgado, C., Alonso-Izquierdo, M., González-Izquierdo, M., Yunta, F., & Eymar, E. (2017). Purification of polluted water with spent mushroom (*Agaricus bisporus*) substrate: from agricultural waste to biosorbent of phenanthrene, Cd and Pb. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 38(13–14), 1792–1799. <https://doi.org/10.1080/09593330.2016.1246614>
- Garzón-Zúñiga, M. A., Buelna, G., & Moeller-Chávez, G. E. (2012). La biofiltración sobre materiales orgánicos, nueva tecnología sustentable para tratar agua residual en pequeñas comunidades e industrias. *Tecnología y Ciencias Del Agua*, 3(3), 153–161.
- Georgescu, A. A., Eliescu, A., Nicolescu, C. M., Bumbac, M., Cioateră, N., Mureșeanu, M., & Buruleanu, L. C. (2019). Performance of *Pleurotus ostreatus* Mushrooms and Spent Substrate for the Biosorption of Cd (II) From Aqueous Solution Performance of *Pleurotus ostreatus* Mushrooms and Spent Substrate for the Biosorption of Cd ( II ). *Analytical Letters*, 59(13), 2007–2027. <https://doi.org/10.1080/00032719.2019.1590380>
- Ghasemi, R., Golbabaei, F., Rezaei, S., Pourmand, M. R., Nabizadeh, R., Jafari, M. J., & Masoorian, E. (2020). A comparison of biofiltration performance based on bacteria and fungi for treating toluene vapors from airflow. *AMB Express*, 10, 8. <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0941-z>
- Ghazvinian, A., Farrokhsiar, P., Vieira, F., Pecchia, J., & Gursoy, B. (2019). Mycelium-Based Bio-Composites For Architecture : Assessing the Effects of Cultivation Factors on Compressive Strength. In J. P. Sousa, G. C. Henriques, & J. P. Xavier (Eds.), *Architecture in the Age of the 4th Industrial Revolutio* (Vol. 2, pp. 505–514). Education and research in Computer Aided Architectural Design in Europe.

- Ghazvinian, A., & Gürsoy, B. (2022). Mycelium-Based Composite Graded Materials : Assessing the Effects of Time and Substrate Mixture on Mechanical Properties. *Biomimetics*, 7, 48.
- Girometta, C., Picco, A. M., Baiguera, R. M., Dondi, D., Babbini, S., Cartabia, M., Pellegrini, M., & Savino, E. (2019). Physico-Mechanical and Thermodynamic Properties of Mycelium-Based Biocomposites : A Review. *Sustainability*, 11(1), 281.  
<https://doi.org/10.3390/su11010281>
- Gloriaikechi-nwogu, C., Akpaja, E. O., Valentine, U., & State, H. R. (2020). Purification of untreated drinking water using *Lentinus squarrosulus*. *Mycopath*, 18, 85–88.
- Gomide, J. A., Noller, C. H., Mott, G. O., Conrad, j. H., & Hill, D. L. (1969). Effect of Plant Age and Nitrogen Fertilization on the Chemical Composition and In Vitro Cellulose Digestibility of Tropical Grasses. *Agronomy Journal*, 61(1), 116–120.
- Gou, L., Li, S., Yin, J., Li, T., & Liu, X. (2021). Morphological and physico-mechanical properties of mycelium biocomposites with natural reinforcement particles. *Construction and Building Materials*, 304, 124656. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2021.124656>
- Gow, N. A. R., Latge, J., & Munro, C. A. (2017). The Fungal Cell Wall : Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiol Spectrum*, 5(3), FUNK-0035-2016.  
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016>.Correspondence
- Gregori, A., Svagelj, M., & Pohleven, J. (2007). Cultivation Techniques and Medicinal Properties of *Pleurotus* spp . *Food Technology and Biotechnology*, 45(3), 238–249.
- Gupta, P., Vishwakarma, M., & Rawtani, P. M. (2009). Assesment of water quality parameters of Kerwa Dam for drinking suitability. *International Journal of Theoretical and Applied Sciences*, 1(2), 53–55.
- Hameed, B. H. (2009). Grass waste : A novel sorbent for the removal of basic dye from aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials*, 166, 233–238.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.11.019>
- Haneef, M., Ceseracciu, L., Canale, C., Bayer, I. S., Heredia-Guerrero, J. A., & Athanassiou, A. (2017). Advanced Materials From Fungal Mycelium : Fabrication and Tuning of

- Physical Properties. *Scientific Reports*, 7, 41292. <https://doi.org/10.1038/srep41292>
- Hanif, A., Bhatti, H. N., & Hanif, M. A. (2015). Removal of zirconium from aqueous solution by *Ganoderma lucidum*: biosorption and bioremediation studies. *Desalination and Water Treatment*, 53(1), 195–205. <https://doi.org/10.1080/19443994.2013.837005>
- Hernández, D., Sánchez, J. E., & Yamasaki, K. (2003). A simple procedure for preparing substrate for *Pleurotus ostreatus* cultivation. *Bioresource Technology*, 90, 145–150. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(03\)00118-4](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(03)00118-4)
- Herrera-Murillo, J., Mora-Campos, D., Suarez-Serrano, A., Chaves-Villalobos, M., Salas-Jiménez, P., Gamboa-Jiménez, A., & Anchía-Leitón, D. (2019). Determinación de los niveles de arsénico presentes en sistemas de abastecimiento de agua de las regiones Chorotega y Huetar Norte de Costa Rica, América Central. *Revista Geográfica de América Central*, 4(61E), 101. <https://doi.org/10.15359/rgac.61-4.5>
- Hoa, H. T., & Wang, C. L. (2015). The effects of temperature and nutritional conditions on mycelium growth of two oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*). *Mycobiology*, 43(1), 14–23. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2015.43.1.14>
- Houette, T., Maurer, C., Niewiarowski, R., & Gruber, P. (2022). Growth and Mechanical Characterization of Mycelium-Based Composites towards Future Bioremediation and Food Production in the Material Manufacturing Cycle. *Biomimetics*, 7, 103. <https://doi.org/10.3390/biomimetics7030103>
- Iliná, A., Martínez-Hernández, J. L., Segura-Ceniceros, E. P., Villarreal-Sánchez, J. A., & Gregorio-Jáuregui, K. M. (2009). Biosorción de arsénico en materiales derivados de maracuyá. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 25(4), 201–216.
- Iqbal, M., & Edyvean, R. G. J. (2005). Loofa sponge immobilized fungal biosorbent: A robust system for cadmium and other dissolved metal removal from aqueous solution. *Chemosphere*, 61, 510–518. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.02.060>
- Iqbal, M., & Saeed, A. (2006). Entrapment of fungal hyphae in structural fibrous network of papaya wood to produce a unique biosorbent for the removal of heavy metals. *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 996–1001.

<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.02.019>

Iqbal, M., & Saeed, A. (2007). Production of an immobilized hybrid biosorbent for the sorption of Ni (II) from aqueous solution. *Process Biochemistry*, *42*, 148–157.

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.07.022>

Iqbal, M., Saeed, A., & Zafar, S. I. (2007). Hybrid biosorbent : An innovative matrix to enhance the biosorption of Cd (II) from aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials*, *148*, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.02.009>

Jack, H. A., Cranston, L. M., Burke, J. L., Knights, M., & Morel, P. C. H. (2020). Determining the chemical composition and in vitro digestibility of forage species used in small ruminant production systems in the english speaking Caribbean – Part 1. *Tropical Agriculture*, *97*(1), 32–45.

Javaid, A., Bajwa, R., Shafique, U., & Anwar, J. (2011). Removal of heavy metals by adsorption on *Pleurotus ostreatus*. *Biomass and Bioenergy*, *35*(5), 1675–1682.

<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.12.035>

Jin, Y., Teng, C., Yu, S., Song, T., Dong, L., Liang, J., Bai, X., Liu, X., Hu, X., & Qu, J. (2018). Batch and fixed-bed biosorption of Cd(II) from aqueous solution using immobilized *Pleurotus ostreatus* spent substrate. *Chemosphere*, *191*, 799–808.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.154>

Joseph, L., Jun, B. M., Flora, J. R. V., Park, C. M., & Yoon, Y. (2019). Removal of heavy metals from water sources in the developing world using low-cost materials: A review. *Chemosphere*, *229*, 142–159. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.04.198>

Joshi, K., Meher, M. K., & Poluri, K. M. (2020). Fabrication and Characterization of Bioblocks from Agricultural Waste Using Fungal Mycelium for Renewable and Sustainable Applications. *ACS Applied Bio Materials*, *3*(4), 1884–1892.

<https://doi.org/10.1021/acsabm.9b01047>

Kamarudzaman, A. N., Chay, T. C., Jalil, M. F. A., & Talib, S. A. (2013). Biosorption of Iron (III) from Aqueous Solution using *Pleurotus ostreatus* Spent Mushroom Compost as Biosorbent. *Advanced Materials Research*, *781–784*, 636–642.

<https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.781-784.636>

- Kamsonlian, S., Suresh, S., Ramanaiah, V., Majumder, C. B., Chand, S., & Kumar, A. (2012). Biosorptive behaviour of mango leaf powder and rice husk for arsenic (III) from aqueous solutions. *International Journal of Environmental Science and Technology*, *9*, 565–578. <https://doi.org/10.1007/s13762-012-0054-6>
- Kapahi, M., & Sachdeva, S. (2017). Mycoremediation potential of Pleurotus species for heavy metals: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, *4*(1). <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0162-8>
- Kirisits, M. J., Emelko, M. B., & Pinto, A. J. (2019). Applying biotechnology for drinking water biofiltration: advancing science and practice. *Current Opinion in Biotechnology*, *57*(June), 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.05.009>
- Krupodorova, T., Barshteyn, V. Y., & Sekan, A. sergiivna. (2021). Review of the basic cultivation conditions influence on the growth of basidiomycetes. *Current Research in Environmental & Applied Mycology (Journal of Fungal Biology)*, *11*(1), 494–531. <https://doi.org/10.5943/cream/11/1/34>
- Kulshreshtha, S. (2019). Removal of pollutants using spent mushrooms substrates. *Environmental Chemistry Letters*, *17*(2), 833–847. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-00840-2>
- Kulshreshtha, S., Mathur, N., & Bhatnagar, P. (2014). Mushroom as a product and their role in mycoremediation. *AMB Express*, *4*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0029-8>
- Kumar, R., Patel, M., Singh, P., Bundschuh, J., Pittman, C. U., Trakal, L., & Mohan, D. (2019). Emerging technologies for arsenic removal from drinking water in rural and peri-urban areas: Methods, experience from, and options for Latin America. *Science of the Total Environment*, *694*, 133427. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.233>
- Kumar, V., & Dwivedi, S. K. (2021). Mycoremediation of heavy metals: processes, mechanisms, and affecting factors. *Environmental Science and Pollution Research*, *28*, 10375–10412. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11491-8>
- Lafi, R., Hamdi, N., & Hafiane, A. (2015). Study of the performance of Esparto grass fibers as

- adsorbent of dyes from aqueous solutions. *Desalination and Water Treatment*, 5, 722–735. <https://doi.org/10.1080/19443994.2014.950993>
- Latgé, J. (2007). MicroReview The cell wall : a carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology*, 66(2), 279–290. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05872.x>
- Lee, T., & Choi, J. (2021). Mycelium-composite panels for atmospheric particulate matter adsorption. *Results in Materials*, 11, 100208. <https://doi.org/10.1016/j.rinma.2021.100208>
- Li, J., Luo, G., He, L., Xu, J., & Lyu, J. (2018). Analytical approaches for determining chemical oxygen demand in water bodies : A review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 48(1), 47–65. <https://doi.org/10.1080/10408347.2017.1370670>
- Li, L., Liang, T., Liu, W., Liu, Y., & Ma, F. (2020). A Comprehensive Review of Mycelial Pellet: Research Status, Applications and Future Prospects. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.0c01325>
- Litter, M. I., Armienta, M. A., Villanueva Estrada, R. E., Villaamil Lepori, E. C., & Olmos, V. (2020). *Arsenic in Latin America: Part II BT - Arsenic in Drinking Water and Food*. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-8587-2\\_5](https://doi.org/10.1007/978-981-13-8587-2_5)
- Luz, J. M. R., Dias, N. M., Albino, P. S., Pereira, T. D., De Cássia, S. M., & Megumi, K. M. C. (2012). Lignocellulolytic enzyme production of *Pleurotus ostreatus* growth in agroindustrial wastes. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1508–1515.
- Machlis, L. (1941). Accumulation Of Arsenic In The Shoots Of Sudan. *Plant Physiology*, 16(3), 521–544.
- Malik, N. A., Kumar, J., Wani, M. S., Tantray, Y. R., & Ahmad, T. (2021). Role of Mushrooms in the Bioremediation of Soil. In G. D. Hamid, R. B. Ahmad, M. M. Aneesul, & K. H. Rehman (Eds.), *Microbiota and Biofertilizers, Vol 2* (pp. 77–102). Springer Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-61010-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-030-61010-4_4)
- Manan, S., Ullah, M. W., Ul-Islam, M., Atta, O. M., & Yang, G. (2021). Synthesis and applications of fungal mycelium-based advanced functional materials. *Journal of*

- Bioresources and Bioproducts*, 6(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jobab.2021.01.001>
- Mehta, A., Dubey, R., & Kumar, S. (2017). Mycofiltration: A Step Towards Sustainable Environment. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(6), 1524–1528. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.606.179>
- Melanouri, E., Dedousi, M., & Diamantopoulou, P. (2022). Cultivating *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* mushroom strains on agro-industrial residues in solid-state fermentation . Part I : Screening for growth , endoglucanase , laccase and biomass production in the colonization phase. *Carbon Resources Conversion*, 5, 61–70. <https://doi.org/10.1016/j.crcon.2021.12.004>
- Membrillo, I., Sánchez, C., Meneses, M., Favela, E., & Loera, O. (2008). Effect of substrate particle size and additional nitrogen source on production of lignocellulolytic enzymes by *Pleurotus ostreatus* strains. *Bioresource Technology*, 99, 7842–7847. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.01.083>
- Membrillo, I., Sánchez, C., Meneses, M., Favela, E., & Loera, O. (2011). Bioresource Technology Particle geometry affects differentially substrate composition and enzyme profiles by *Pleurotus ostreatus* growing on sugar cane bagasse. *Bioresource Technology*, 102(2), 1581–1586. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.091>
- Mleczek, M., Niedzielski, P., Siwulski, M., Rzymiski, P., Gąsecka, M., Goliński, P., Kozak, L., & Kozubik, T. (2016). Importance of low substrate arsenic content in mushroom cultivation and safety of final food product. *European Food Research and Technology*, 242, 355–362. <https://doi.org/10.1007/s00217-015-2545-4>
- Mohd, M. J. F., Kamal, E. B., Noor, E. N. A., & Ramli, N. (2022). Mycelium-based composite : a way forward for renewable material. *Journal of Sustainability Science and Management*, 17(1), 271–280.
- Mohebbad, B., Bonyadi, Z., Dehghan, A. A., & Rahmat, M. H. (2019). Arsenic removal from aqueous solutions using *Saccharomyces cerevisiae*: Kinetic and equilibrium study. *Environmental Progress and Sustainable Energy*, 38(s1), S398–S402. <https://doi.org/10.1002/ep.13074>

- Mongiiov, C., Morin-crini, N., Lacalamita, D., Bradu, C., Raschetti, M., Placet, V., Lado, A. R. R., Ivanovska, A., Kostic, M., & Crini, G. (2021). Biosorbents from Plant Fibers of Hemp and Flax for Metal Removal: Comparison of Their Biosorption Properties. *Molecules*, *26*, 4199.
- Mumtazuddin, S., & Azad, A. K. (2012). Removal of Arsenic Using Mango, Java Plum and Neem tree barks. *International Journal Of Advances In Pharmacy, Biology And Chemistry*, *1*(3), 372–376.
- Nashiruddin, I. N., Shin, K. C., Fadziyana, A. M., Rahman, R. A., Choy, J. L., Wan, N. A., & El Enshasy, H. (2022). Effect of growth factors on the production of mycelium - based biofoam. *Clean Technologies and Environmental Policy*, *24*, 351–361.  
<https://doi.org/10.1007/s10098-021-02146-4>
- Noman, E., Al-Gheethi, A., Mohamed, R. M. S. R., & Talip, B. A. (2019). Myco-Remediation of Xenobiotic Organic Compounds for a Sustainable Environment: A Critical Review. *Topics in Current Chemistry*, *377*, 17. <https://doi.org/10.1007/s41061-019-0241-8>
- Okedeyi, O. O., Dube, S., Awofolu, O. R., & Nindi, M. M. (2014). Assessing the enrichment of heavy metals in surface soil and plant (*Digitaria eriantha*) around coal-fired power plants in South Africa. *Environmental Science and Pollution Research*, *21*(6), 4686–4696. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2432-0>
- Osarenotor, O., Essandoh, H. M. K., & Aighewi, I. T. (2021). Removal of pollutants by mycelium-colonized sawdust. *Water Practice and Technology*, *16*(3), 1036–1047.  
<https://doi.org/10.2166/wpt.2021.028>
- Osbourn, D. F. (1969). The introduction of pangola grass into the caribbean islands. *Grass and Forage Science*, *24*, 76–81.
- Pachaiappan, R., Cornejo-Ponce, L., Rajendran, R., Manavalan, K., Femilaa Rajan, V., & Awad, F. (2022). A review on biofiltration techniques: recent advancements in the removal of volatile organic compounds and heavy metals in the treatment of polluted water. *Bioengineered*, *13*(4), 8432–8477.  
<https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2050538>

- Palin, D., Rufato, K. B., Linde, G. A., Colauto, N. B., Caetano, J., Alberton, O., Jesus, D. A., & Dragunski, D. C. (2016). Evaluation of Pb (II) biosorption utilizing sugarcane bagasse colonized by Basidiomycetes. *Environmental Monitoring and Assessment*, 188(5), 279. <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5257-8>
- Panichev, N., Mandiwana, K., Moema, D., Molatlhegi, R., & Ngobeni, P. (2006). Distribution of vanadium(V) species between soil and plants in the vicinity of vanadium mine. *Journal of Hazardous Materials*, 137(2), 649–653. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.03.006>
- Pavlov, I. N., & Litovka, Y. A. (2021). Novel materials for myco-decontamination of cyanide-containing wastewaters through microbial biotechnology. *Materials Science Forum*, 1037 MSF(July), 751–758. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/MSF.1037.751>
- Pérez, G., Lopez-moya, F., Chuina, E., Ibañez-vea, M., Garde, E., López-Llorca, L. V., Pisabarro, A. G., & Ramírez, L. (2021). Strain Degeneration in *Pleurotus ostreatus* : A Genotype Dependent Oxidative Stress Process Which Triggers Oxidative Stress , Cellular Detoxifying and Cell Wall Reshaping Genes. *Journal of Fungi*, 7, 862.
- Pini, A. K., & Geddes, P. (2020). Fungi Are Capable of Mycoremediation of River Water Contaminated by *E. coli*. *Water, Air, and Soil Pollution*, 231(2). <https://doi.org/10.1007/s11270-020-4464-7>
- Pitman, W. D., Chambliss, C. G., & Hacker, J. B. (2004). Digitgrass and Other Species of Digitaria. In L. E. Moser, B. L. Burson, & L. E. Sollenberger (Eds.), *Warm-Season (C4) Grasses* (pp. 715–743). American Society of Agronomy.
- Pozzobon, M. T., Glatzle, A., Conterato, I. F., SCHIFINO-WITTMANN, M. T., & SMIDERLE, V. G. (2006). Variation in chromosome number and its relationship with agronomic characteristics in a germplasm collection of *Digitaria eriantha sensu lato*. *Tropical Grasslands*, 40, 157–164.
- Raman, J., Kab-Yeul, J., Lakshmanan, H., Won-Sik, K., & Gajendran, B. (2021). Mycoremediation: An Elimination of Metal and Non-metal Inclusions from Polluted Soil. In S. Rajendran, M. Naushad, L. P. Cornejo, & E. Lichtfouse (Eds.), *Metal, Metal-Oxides*

*and Metal-Organic Frameworks for Environmental Remediation* (pp. 239–259). Springer Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-68976-6\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-030-68976-6_9)

- Ramanaiah, S. V., Mohan, S. V., & Sarma, P. N. (2007). Adsorptive removal of fluoride from aqueous phase using waste fungus (*Pleurotus ostreatus* 1804) biosorbent : Kinetics evaluation. *Ecological Engineering*, *31*, 47–56.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2007.05.006>
- Rangabhashiyam, S., Suganya, E., Selvaraju, N., & Varghese, L. A. (2014). Significance of exploiting non-living biomaterials for the biosorption of wastewater pollutants. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *30*(6), 1669–1689.  
<https://doi.org/10.1007/s11274-014-1599-y>
- Rigobello, A., & Ayres, P. (2022). Compressive behaviour of anisotropic mycelium - based composites. *Scientific Reports*, *12*, 6846. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10930-5>
- Rodríguez, V. A. (29 de Marzo del 2020). COVID-19 revive preocupación de agua con arsénico en Bagaces. La Voz de Guanacaste. Recuperado de <https://vozdeguanacaste.com/covid-19-revive-preocupacion-de-agua-con-arsenico-en-bagaces/>
- Rozman, U., Kalčíková, G., Marolt, G., Skalar, T., & Žgajnar Gotvajn, A. (2020). Potential of waste fungal biomass for lead and cadmium removal: Characterization, biosorption kinetic and isotherm studies. *Environmental Technology and Innovation*, *18*, 100742.  
<https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.100742>
- Saeed, A., Akhter, M. W., & Iqbal, M. (2005). Removal and recovery of heavy metals from aqueous solution using papaya wood as a new biosorbent. *Separation and Purification Technology*, *45*, 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2005.02.004>
- Saikia, R., Goswami, R., Bordoloi, N., Senapati, K. K., Pant, K. K., Kumar, M., & Kataki, R. (2017). Removal of arsenic and fluoride from aqueous solution by biomass based activated biochar: Optimization through response surface methodology. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *5*(6), 5528–5539.  
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2017.10.027>

- Sainos, E., Díaz-Godínez, G., Loera, O., Montiel-González, A. M., & Sánchez, C. (2006). Growth of *Pleurotus ostreatus* on wheat straw and wheat-grain-based media: Biochemical aspects and preparation of mushroom inoculum. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(4), 812–815. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0363-0>
- Salmones, D., Mata, G., & Waliszewski, K. N. (2005). Comparative culturing of *Pleurotus* spp. on coffee pulp and wheat straw: Biomass production and substrate biodegradation. *Bioresource Technology*, 96, 537–544. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.06.019>
- Santos, E. E., Cárdenas, J. F., Torre, M. E., Martínez, V. M., Rodríguez, A., & Acosta, I. (2017). Bioadsorción de arsénico (III) en solución acuosa por la biomasa modificada de *Aspergillus niger*. *Avances En Ciencias e Ingeniería*, 8(2), 1–10.
- Sarda, P., & Sadgir, P. (2015). Assessment of Multi Parameters of Water Quality in Surface Water Bodies-A Review. *International Journal for Research in Applied Science & Engineering Technology (IJRASET)*, 3(8), 331–336.
- Sari, A., & Tuzen, M. (2009). Biosorption of As(III) and As(V) from aqueous solution by macrofungus (*Inonotus hispidus*) biomass: Equilibrium and kinetic studies. *Journal of Hazardous Materials*, 164(2–3), 1372–1378. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.09.047>
- Šćiban, M., Klačnjak, M., & Škrbić, B. (2008). Adsorption of copper ions from water by modified agricultural by-products. *Desalination*, 229(1–3), 170–180. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2007.08.017>
- Sekhar, K. C., Chary, N. S., Kamala, C. T., Rao, J. V., Balaram, V., & Anjaneyulu, Y. (2003). Risk assessment and pathway study of arsenic in industrially contaminated sites of Hyderabad: a case study. *Environment International*, 29, 601–611. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(03\)00017-5](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(03)00017-5)
- Shahsavari, E., Adetutu, E. M., Anderson, P. A., & Ball, A. S. (2013). Plant residues — A low cost , effective bioremediation treatment for petrogenic hydrocarbon-contaminated soil. *Science of the Total Environment*, 443, 766–774. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.11.029>

- Shakoor, M. B., Niazi, N. K., Bibi, I., Shahid, M., Sharif, F., Bashir, S., Shaheen, S. M., Wang, H., Tsang, D. C. W., Ok, Y. S., & Rinklebe, J. (2018). Arsenic removal by natural and chemically modified water melon rind in aqueous solutions and groundwater. *Science of the Total Environment*, *645*, 1444–1455.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.218>
- Sharma, S., & Bhattacharya, A. (2017). Drinking water contamination and treatment techniques. *Applied Water Science*, *7*(3), 1043–1067. <https://doi.org/10.1007/s13201-016-0455-7>
- Sherief, A. A., El-Tanash, A. B., & Temraz, A. M. (2010). Lignocellulolytic Enzymes and Substrate Utilization During Growth and Fruiting of *Pleurotus ostreatus* on Some Solid Wastes. *Journal of Environmental Science and Technology*, *3*(1), 18–34.  
<https://doi.org/10.3923/jest.2010.18.34>
- Sivaprasad, S., Byju, S. K., Prajith, C., Shaju, J., & Rejeesh, C. R. (2021). Development of a novel mycelium bio-composite material to substitute for polystyrene in packaging applications. *Materials Today: Proceedings*, *47*(15), 5038–5044.  
<https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.04.622>
- Sud, D., Mahajan, G., & Kaur, M. P. (2008). Agricultural waste material as potential adsorbent for sequestering heavy metal ions from aqueous solutions – A review. *Bioresource Technology*, *99*, 6017–6027. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.064>
- Sultana, R., & Katsuichiro, K. (2011). Potential of barnyard grass to remediate arsenic-contaminated soil. *Weed Biology and Management*, *11*, 12–17.  
<https://doi.org/10.1111/j.1445-6664.2011.00400.x>
- Sumalatha, B., Kumar, P. Y., & King, P. (2017). Removal of Arsenic from aqueous solutions using *Turbinaria vulgaris* sp. as biosorbent. *International Journal of Advance Research in Science and Engineering*, *6*(7), 217–223.
- Sydor, M., Cofta, G., Doczekalska, B., & Bonenberg, A. (2022). Fungi in Mycelium-Based Composites : Usage and Recommendations. *Materials*, *15*, 6283.
- Tajernia, H., Ebadi, T., Nasernejad, B., & Ghafari, M. (2014). Arsenic Removal from Water

- by Sugarcane Bagasse : An Application of Response Surface Methodology (RSM). *Water, Air, & Soil Pollution*, 225, 2028. <https://doi.org/10.1007/s11270-014-2028-4>
- Tay, C., Liew, H., Redzwan, G., Yong, S., Surif, S., & Abdul-talib, S. (2011). Pleurotus ostreatus spent mushroom compost as green biosorbent for nickel (II) biosorption. *Water Science & Technology* |, 64(12), 2425–2433. <https://doi.org/10.2166/wst.2011.805>
- Taylor, A., Flatt, A., Beutel, M., Wolff, M., Brownson, K., & Stamets, P. (2015). Removal of Escherichia coli from synthetic stormwater using mycofiltration mycofiltration. *Ecological Engineering*, 78, 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.05.016>
- Thakur, M. (2019). Mushrooms as a biological tool in mycoremediation of polluted soils. In T. Jindal (Ed.), *Emerging Issues in Ecology and Environmental Science* (pp. 27–42). Springer Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-99398-0>
- Titshall, L. W., Hughes, J. C., Morris, C. D., & Zacharias, P. J. K. (2007). The Disposal of a Lime Water Treatment Residue on Soil and Spoil Material from a Coalmine. *Journal of Environmental Quality*, 36(2), 568–579. <https://doi.org/10.2134/jeq2006.0268>
- Tsvetkova, E., Bezlova, D., Karatoteva, D., Malinova, L., & Kolev, G. (2012). Assessment of heavy metals and arsenic content in grasslands of bulgarka nature park. *Genetics and Plant Physiology*, 2(3–4), 161–170.
- Tuor, U., Winterhalter, K., & Fiechter, A. (1995). Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation ecological determinants for wood decay. *Journal of Biotechnology*, 41, 1–17.
- Valášková, V., & Baldrian, P. (2006). Estimation of bound and free fractions of lignocellulose-degrading enzymes of wood-rotting fungi Pleurotus ostreatus , Trametes versicolor and Piptoporus betulinus. *Research in Microbiology*, 157, 119–124. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.06.004>
- Vašatko, H., Gosch, L., Jauk, J., & Stavric, M. (2022). Basic Research of Material Properties of Mycelium-Based Composites. *Biomimetics*, 7, 51.
- Vaverková, M. D., Adamcová, D., Radziemska, M., Voběrková, S., Mazur, Z., & Zloch, J. (2018). Assessment and Evaluation of Heavy Metals Removal from Landfill Leachate by

- Pleurotus ostreatus. *Waste and Biomass Valorization*, 9(3), 503–511.  
<https://doi.org/10.1007/s12649-017-0015-x>
- Vega, A. S., & Rógolo, Z. E. (2007). Novedades Taxonómicas y Sinopsis del Género *Digitaria* (Poaceae, Panicoideae, Paniceae) en América Central. *Darwiniana*, 45(1), 92–119.
- Vicente Reyes, J. (2016). Determinación de la eficiencia del aserrín y la fibra de coco utilizados como empaques para la remoción de contaminantes en Biofiltros para el tratamiento de aguas residuales. *Enfoque UTE*, 7(3), 41–56.  
<http://ingenieria.ute.edu.ec/enfoqueute/>
- Vieira, R. F., & de Andrade, M. C. N. (2016). Optimization of substrate preparation for oyster mushroom ( *Pleurotus ostreatus* ) cultivation by studying different raw materials and substrate preparation conditions ( composting : phases I and II ). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32, 190. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2152-y>
- Walker, D. B., Baumgartner, D. J., Gerba, C. P., & Fitzsimmons, K. (2019). Surface Water Pollution. In *Environmental and Pollution Science* (3rd ed.). Elsevier Inc.  
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814719-1.00016-1>
- Walker, G. M., & White, N. A. (2017). Introduction to Fungal Physiology. In K. Kavanagh (Ed.), *Fungi: Biology and Applications* (third edit, pp. 1–35). Wiley Blackwell.  
<https://doi.org/10.1002/0470015330.ch1>
- Xue, W. N., & Peng, Y. B. (2014). Biosorption of arsenic (III) from aqueous solutions by industrial fermentation waste *Aspergillus niger*. *Applied Mechanics and Materials*, 448–453, 791–794. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.448-453.791>
- Yadav, P., Rai, S. N., Mishra, V., & Singh, M. P. (2021). Mycoremediation of environmental pollutants: a review with special emphasis on mushrooms. *Environmental Sustainability*, 4, 605–618. <https://doi.org/10.1007/s42398-021-00197-3>
- Yan, Z., Zhao, M., Wu, X., & Zhang, J. (2020). Metabolic Response of *Pleurotus ostreatus* to Continuous Heat Stress. *Frontiers in Microbiology*, 10, 3148.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03148>
- Yang, F., Xie, S., Wei, C., Liu, J., Zhang, H., Chen, T., & Zhang, J. (2018). Arsenic

characteristics in the terrestrial environment in the vicinity of the Shimen realgar mine, China. *Science of the Total Environment*, 626, 77–86.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.079>

Yang, L., Park, D., & Qin, Z. (2021). Material Function of Mycelium-Based Bio-Composite : A Review. *Frontiers in Materials*, 8, 737377. <https://doi.org/10.3389/fmats.2021.737377>

Zacarías, S. M., Beltrán, V. M., Torres, B. L. G., & González, A. A. (2012). Assessment of in situ and ex situ phytoremediation with grass mixtures in soils polluted with nickel, copper, and arsenic. *Physics and Chemistry of the Earth*, 37–39, 52–57.

<https://doi.org/10.1016/j.pce.2010.11.006>

Zharare, G. E., Kabanda, S. M., & Poku, J. Z. (2010). Effects of temperature and hydrogen peroxide on mycelial growth of eight *Pleurotus* strains. *Scientia Horticulturae*, 125(2), 95–102. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2010.03.006>

Zolnowski, A. C., Cieccko, Z., & Najmowicz, T. (2010). Arsenic content in and uptake by plants from arsenic-contaminated soil. In A. P. Kulakow & V. V. Pidlisnyuk (Eds.), *Application of Phytotechnologies for Cleanup of Industrial, Agricultural and Wastewater Contamination* (pp. 135–145). Springer Dordrecht.

Zoysa, L. D. M., Perera, P. C. D., Peramunagama, S. S. M., & Kumara, K. L. W. (2020). Effect of selected heavy metals on the growth performance and yield of commercially cultivated American oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Tropical Agricultural Research and Extension*, 23(3–4), 52–59. <https://doi.org/10.4038/tare.v23i3-4.5497>