



Universidad De Chile
Facultad De Ciencias
Escuela De Pregrado

Sistematización de pruebas de crecimiento en medios de cultivo sólido para hongos silvestres descomponedores de madera en el contexto del desarrollo de biomateriales de micelio. Caso de estudio: Monumento Abierto.

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Felipe Alberto Muñoz Castillo

Director del Seminario de Título: Aníbal Fuentes Palacios

Co-Director: Andrés Romero Quezada

Patrocinante: Inmaculada Vaca Cerezo

Septiembre 2020

Santiago - Chile

BIOGRAFÍA



Nací en Calama un 20 de noviembre del año 1996. Hijo de Agustín Muñoz, ex-carabinero, y Juana Castillo, parvularia, emprendedora y técnico jurídico. Hermano de Mauricio, arquitecto y Pablo, geólogo. Tío de Benjamín y Agustina. Estudié en el colegio Padre Alberto Hurtado desde primero básico a cuarto medio. Llegué a Santiago el año 2015 para estudiar biotecnología. He dedicado mis años en la universidad a explorar las posibilidades de salir de la burbuja académica, participando de agrupaciones como GreenDoor (2016) y el Team UChile_Biotec (2017 y 2018). También he dedicado mi tiempo al deporte, durante estos años retomé mi pasión por la natación dejada de lado el año 2013 participando desde el año 2016 por el equipo de Juan Gómez Millas y por la Selección de la Universidad hasta comienzos del 2019. En ambos equipos, he crecido y he conocido gente valiosa para mi vida. En mis tiempos libres, me dedico a componer música.

Fui practicante de meditación Maum, método que sugiero fuertemente practicar en algún punto de la vida.

Actualmente, dedicado a explorar las posibilidades del Reino Fungi.

DEDICATORIA

A mis padres...

*Ser buenos padres, es una opción.
Ser excelentes en ello, es una cualidad.
Ustedes cumplen ambos. Gracias por todo.*

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio de Biofabricación FADEU de la Pontificia Universidad Católica por brindarme la oportunidad de desarrollar mi unidad de investigación y seminario de título en sus dependencias, disponiendo sus recursos y el conocimiento de su gente para ello.

Aníbal F., Catalina DP., Sebastián R., Andrés R., Francisco C., Gabriela F., Ricardo A., Matías E., Francisca F., Tania P., Claudia R., Carolina P., Sebastián A., Daniel M., Francisca Z., Galit H., Esteban L., German G., Guillermo A., Claudia G. y Antonia V. y los voluntarios de Monumento Abierto, gracias por todo.

A RedFungi, por la colaboración del equipo de trabajo de Fernán Federici, Isaac, Tamara y Daniel, junto con la Fundación Fungi, de mano de Daniela Torres y Giuliana Furci.

A Hongos de Chile, por permitir al equipo de Monumento Abierto utilizar sus dependencias para los trabajos de este proyecto. De igual forma, agradezco a Rafael Astaburuaga por su apoyo desinteresado en el desarrollo de esta obra.

A David Benjamin y su equipo de The Living Studio, por su contribución en el proyecto en el área de arquitectura.

Al Museo del Hongo y su director, Juan Ferrer, por contribuir en la producción de la obra y permitir la exposición de los ladrillos de Monumento Abierto en la Aparición Infinita.

A Iván Navarro por su participación en la postulación al fondo del MOP como artista de Monumento Abierto.

A Rodrigo Arteaga, por permitirme contribuir en su trabajo artístico de esculturas de micelio.

A Aníbal Fuentes, por confiar en mi trabajo y aventurarse a guiar el desarrollo de este proyecto de título, sobre el cual ha dedicado un gran compromiso y entrega.

A Andrés Romero, por su fundamental apoyo en el desarrollo de este trabajo y por su orientación en lo académico, profesional y personal en mi proceso de término de carrera.

A la Dra. Inmaculada Vaca por confiar en mi propuesta de proyecto de investigación y asumir el patrocinio de esta misma.

A Fernán Federici, por asumir la tutoría de mi unidad de investigación.

A mis amigos Tatiana, Enzo, Paula, Sebastián, Francisca, Vicente, Natalie, Ignacio y Alam, por su fundamental apoyo y amistad durante estos 5 años de universidad. Todo ha sido más grato gracias a ustedes. Sinceramente gracias.

A Tatiana, por su vital compañía y especial apoyo en el último tiempo. Gracias ti, y tus padres, Marisol y Alberto, por brindarme un grato espacio en su familia.

A Marlen, José, Nicolás, Salvador y al centro de meditación Maum junto con sus asistentes: Kim, Lee, Cristian y Matilda, sin su ayuda, hoy no estaría presentando este trabajo. Gracias por todo.

A Benjamín y Agustina, por darme razones para trabajar por un mejor futuro. A Marlen, Mauricio y Pablo, gracias por guiarme con gran sabiduría en mi crecimiento personal desde que tengo memoria. Y finalmente, a mis padres, por su apoyo incondicional desde la distancia en mi proceso universitario y en la vida.

En la línea del Open Source, los diagramas elaborados para este trabajo se realizaron utilizando iconografía bajo licencia Creative Commons de la página web The Noun Project. A continuación, dejo una lista de los creadores de este contenido a modo de agradecimiento: Andrei Yushchenko, Andriwidodo, B Farías, Eucalyp, Danil Polshin, David, Gabriel Figueiredo, Ibrandifi, HLD, Lluisa Iborra, Maria Zamchy, Megan Chown, Oleksandr Panasovskyi, Olena Panasovska, Payungkead Im-anong, Priyanka, ProSymbolis, Strongicon, Symbolon, Turkub, Vectors Market, Vicons Design.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

BIOGRAFÍA	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiv
INTRODUCCIÓN	1
1. Biomateriales de micelio	3
2. Laboratorio de Biofabricación FADEU	7
3. Monumento Abierto	7
4. Antecedentes	10
5. Sistematización	11
6. Objetivos	13
Objetivo general	13
Objetivos específicos	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
Materiales	14
1. Crecimiento en placa	15
1.1 Cultivos de hongos	15
1.2 Preparación de placas e inoculación	15
1.3 Registro de placas	16
1.4 Análisis digital	16
1.5 Procesamiento de datos	16
1.6 Análisis estadístico	17
2. Crecimiento en <i>spawn</i>	18
2.1 Preparación de sustrato de <i>spawn</i>	18

2.2 Inoculación de <i>spawn</i>	21
2.3 Tratamiento y registro de <i>spawn</i>	21
2.4 Análisis de registros	22
RESULTADOS	23
1. Prueba de crecimiento en placa	23
2. Prueba de crecimiento en <i>spawn</i>	30
DISCUSIÓN	35
1. Prueba de crecimiento en placa	35
2. Prueba de crecimiento en <i>spawn</i>	43
CONCLUSIONES	43
BIBLIOGRAFÍA	51
ANEXO	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros de regresión de Gompertz obtenidos a partir del ajuste de los valores de diámetro de colonia respecto al tiempo.	25
Tabla 2. Incidencia de contaminantes para los 3 hongos de estudio en los tratamientos de agitación y sin agitación, antes y después de la agitación del día 12.	32
Tabla 1 Anexo. Registro de incremento radial (cm) en el tiempo (días) para los hongos KRK27, KRK78, <i>Pleurotus ostreatus</i> , KRK252 y KRK283.	68
Tabla 2 Anexo. Desviaciones estándar para los registros de incremento radial (cm) en el tiempo (días) para los hongos KRK27, KRK78, <i>Pleurotus ostreatus</i> , KRK252 y KRK283.	69
Tabla 3 Anexo. Análisis ANOVA unidireccional para el parámetro “A” del modelo de Gompertz basado en el test de Tukey con un porcentaje de confianza de 95%.	70
Tabla 4 Anexo. Análisis ANOVA unidireccional para el parámetro “m” del modelo de Gompertz basado en el test de Tukey con un porcentaje de confianza de 95%.	71
Tabla 5 Anexo. Análisis ANOVA unidireccional para el parámetro “m” del modelo de Gompertz basado en el test de Tukey con un porcentaje de confianza de 95%.	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de flujo de elaboración propia del proceso de biofabricación en comparación al proceso de cultivo de hongos comestibles.	5
Figura 2. Proceso de producción de <i>spawn</i> en <i>mushbags</i> .	18
Figura 3. Proceso de preparación de <i>mushbags</i> .	20
Figura 4. <i>Mushbags</i> con trigo dispuestas para la esterilización por autoclave.	21
Figura 5. Gráfico de incremento de diámetro de colonia en placa en el tiempo por las distintas cepas respecto al tiempo.	24
Figura 6. Gráfico con valores del parámetro “m” de la ecuación de Gompertz para las cepas fúngicas KRK27, KRK78, <i>P. ostreatus</i> , KRK252 y KRK283.	26
Figura 7. Gráfico con valores del parámetro “A” de la ecuación de Gompertz para las cepas fúngicas KRK27, KRK78, <i>P. ostreatus</i> , KRK252 y KRK283.	27
Figura 8. Gráfico con valores del parámetro “l” de la ecuación de Gompertz para las cepas fúngicas KRK27, KRK78, <i>P. ostreatus</i> , KRK252 y KRK283.	27
Figura 9. Colonización de KRK27, KRK78, KRK283, KRK252 y <i>P. ostreatus</i> en placas con PDA al día 17 de registro.	29
Figura 10. Escala de progreso de registro fotográfico de colonización del hongo <i>P. ostreatus</i> en <i>spawn</i> desde el día 1 al día 12.	31
Figura 11. Esquema de incidencia de contaminantes para los triplicados de los 3 hongos de estudio agitados y no agitados durante el periodo de estudio, antes y después de la agitación del día 12.	34
Figura 1 Anexo. Biomateriales elaborados a partir del cultivo de cepa <i>Trametes versicolor</i> en una mezcla de cáscara de nuez con bagazo de cerveza. Cortesía de BioFab UC.	61
Figura 2 Anexo. Proyección tridimensional del montaje de las estructuras de Monumento Abierto.	61
Figura 3 Anexo. Registro fotográfico de ladrillos generados durante el proceso productivo de Monumento Abierto.	62
Figura 4 Anexo. Comparación de colonización en placa de 6 cepas del laboratorio.	62
Figura 5 Anexo. Metodología lineal planteada a comienzos de MA para la producción de ladrillos de micelio.	63

Figura 6 Anexo. Registro fotográfico a los 15 días de incubación desde la inoculación de las cepas KRK27 y KRK78 en paja de trigo.	63
Figura 7 Anexo. Registro del proceso de horneado de un ladrillo de micelio.	64
Figura 8 Anexo. Comparación de <i>spawn</i> generado en el laboratorio y producido por la empresa Micosecha.	64
Figura 9 Anexo. Registro de contaminantes detectados en los <i>spawn</i> de KRK27, KRK78 y <i>Pleurotus ostreatus</i> durante el periodo de incubación.	65
Figura 10 Anexo. Registro de contaminantes detectados en los <i>spawn</i> que no fueron inoculados con micelio, utilizados como controles.	66
Figura 11 Anexo. Esquema de incidencia de contaminantes para los 3 hongos de estudio al día 12.	67

LISTA DE ABREVIATURAS

AST: Agar Salvado de Trigo

BioFab: Laboratorio de Biofabricación de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

FES: Fermentación en Estado Sólido

MA: Monumento Abierto

MEA: Malt-Extract Agar

MOP: Ministerio de Obras Públicas

PDA: Potato-Dextrose Agar

PDB: Potato-Dextrose Broth

RESUMEN

El desarrollo de biomateriales elaborados con micelio de hongos, ha emergido desde las áreas del diseño y la arquitectura, en búsqueda de alternativas sustentables a distintos materiales convencionales, tales como los utilizados en construcción o en la industria textil. Durante el año 2019, se desarrolló en el Laboratorio de Biofabricación FADEU PUC (BioFab-UC) el proyecto Monumento Abierto, que se planteó como una obra arquitectónica montada a partir de ladrillos de micelio. Diversos procesos llevados a cabo durante el desarrollo de la obra, requerían ser estandarizados debido a que se realizaron de forma exploratoria más que metódica. El presente trabajo tiene como objetivo la sistematización de las pruebas de crecimiento en placa y en *spawn*, para dos hongos silvestres descomponedores de madera pertenecientes al cepario del laboratorio: KRK27 y KRK78. Estos, fueron identificados morfológicamente como *Trametes versicolor* y *Bjerkandera adusta*, respectivamente. Para la prueba de crecimiento en placa, se registró el crecimiento de superficie en medio de cultivo PDA para los hongos en estudio en comparación a los hongos silvestres descomponedores de madera KRK252 y KRK283, y al hongo comercial *Pleurotus ostreatus*. A partir de este registro, se obtuvieron tasas de crecimiento radial mediante la aplicación de la regresión de Gompertz con la modificación de Zwietering. El modelo utilizado, se ajustó para los datos de todas las cepas con excepción de KRK283. Además, se obtuvo que las cepas KRK27 y KRK78 presentaron tasas de crecimiento radial superiores a *P. ostreatus*. De esta forma, la metodología utilizada en la presente investigación permitió sistematizar la prueba de crecimiento en placa, sin embargo, los resultados sugieren que esta es aplicable sólo a hongos que generen colonias regulares y circulares al crecer en medios de cultivo sólido. Para futuras aplicaciones, la metodología debe

contemplar el uso de medios de cultivo lignocelulósicos para emular el contenido nutricional que tienen los sustratos que se utilizan para elaborar biomateriales de micelio, los que suelen ser desechos agroindustriales. Por otro lado, se sistematizó la prueba de crecimiento en *spawn* de trigo para las cepas KRK27 y KRK78 en comparación a *P. ostreatus*, donde se evaluó la colonización del micelio de estos hongos aplicando un procedimiento de agitación del sustrato. Los *spawn* agitados y no agitados de los tres hongos presentaron contaminantes, sugiriendo que el protocolo utilizado debe ser sujeto a mejoras en términos de esterilización del sustrato. Además, la tasa de contaminación fue superior en los *spawn* de hongos silvestres que se agitaron, respecto a los que no se agitaron. Se plantea como posible explicación a lo anterior, el hecho de que la abundancia de micelio en los *spawn* de las cepas silvestres después de ser sometidas a agitación es menor respecto a los no agitados, implicando una mayor exposición del sustrato a brotes de contaminantes después de cada agitación. De esta forma, en procesos de biofabricación que incorporen la utilización de *spawn*, debe contemplarse que el micelio de algunos hongos puede presentar una disminución de su abundancia tras procedimientos de rutina como la agitación del sustrato.

ABSTRACT

The development of mycelium-based biomaterials from filamentous fungi is a field of research that has emerged from the areas of design and architecture, in search of sustainable alternatives to different conventional materials such as those used in construction or in textil industry. During 2019, the “Monumento Abierto” Project was developed by Laboratorio de Biofabricación FADEU PUC (BioFab-UC), which was planned as an architectural structure assembled from mycelium bricks. Several processes carried out during the development of the work, required to be standardized because they were carried out in an exploratory rather than methodical way. The objective of this work is to systematize the growth tests in plate and spawn, for two wild wood decomposing fungi belonging to the laboratory stock: KRK27 and KRK78. These were morphologically identified as *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta*, respectively. For the plate growth test, the surface growth in PDA culture medium was recorded for the fungi under study in comparison to the wild wood decomposing fungi KRK252 and KRK283, and the commercial fungus *Pleurotus ostreatus*. With this data, radial growth rates were obtained by applying the Gompertz regression with the Zwietering modification. The model used was fitted for the data of all the strains with exception of KRK283. In addition, KRK27 and KRK78 presented higher radial growth rates than *P. ostreatus*. In this way, the methodology used in the present investigation allowed to systematize the plate growth test, however, the results suggest that it is applicable only to fungi that generate regular and circular colonies when growing in solid culture media. For future applications, this methodology should include the use of lignocellulosic culture medium to emulate the nutritional content of substrates used to

fabricate mycelium-based biomaterials, which are usually agro-industrial waste. On the other hand, the growth test in wheat spawn was systematized for strains KRK27 and KRK78 compared to *P. ostreatus* to evaluate the colonization of the mycelium of these fungi by applying a substrate agitation procedure. The agitated and non-agitated spawn of the three fungi presented contaminants, suggesting that the protocol used should be subject to improvements in terms of sterilization of the substrate. In addition, the contamination rate was higher in wild fungi spawn that were agitated compared to those that were not agitated. As a possible explanation for this, it is proposed that the fact that the abundance of mycelium in the spawn of wild strains after being subjected to agitation is lower compared to the non-agitated ones, implies a greater exposure to the substrate to outbreaks competitors after every agitation. Thus, in biofabrication processes that incorporate the use of spawn, it should be considered that the mycelium of some fungi may show a decrease in its abundance after routine procedures such as agitation substrate.

INTRODUCCIÓN

La utilización de los organismos del reino Fungi tiene un rol importante en diversas actividades humanas, desde el tradicional uso de levaduras para la producción del vino, la cerveza y el pan, hasta el importante rol en la generación de conocimiento científico y médico a través del descubrimiento y la producción de antibióticos, entre otros (Kavanagh, 2005). Considerando lo vasto de este reino, sobre el que se estima que existen un aproximado de 5.1 millones de especies en el mundo (Blackwell, 2011), diversos hongos que van desde especies unicelulares hasta los más complejos hongos filamentosos, han sido ampliamente utilizados por la industria biotecnológica para la obtención de múltiples enzimas de interés industrial, antibióticos, vitaminas, compuestos farmacéuticos, hormonas, ácidos orgánicos, entre otros (Nevalainen y cols., 2004). Uno de los campos de investigación con gran potencial biotecnológico es el desarrollo de biomateriales a partir de micelio de hongos (Attias y cols., 2017; Joshi y cols., 2020). El micelio es el tejido vegetativo de los hongos filamentosos, constituido por una red de estructuras celulares filamentosas llamadas hifas, las que se compartimentalizan mediante una pared celular compuesta principalmente por el polisacárido quitina (Carlile y cols., 2001). En el contexto de los biomateriales, la utilización de hongos filamentosos presenta ventajas sobre otros tipos de organismos debido a la capacidad de fusión que presentan las hifas al crecer sobre un determinado sustrato, permitiendo obtener una gran resistencia en relación al peso del material (Attias y cols., 2020). Este fenómeno de fusión lleva por nombre anastomosis y está involucrado en los procesos de apareamiento de líneas germinales de esporas de hongos ascomicetes y basidiomicetes, y en la maduración del tejido vegetativo del hongo (Glass y cols., 2004;

Raudaskoski, 2015). El micelio más utilizado en este tipo de materiales, es el de hongos de pudrición blanca (Teixeira y cols., 2019; Elsacker, 2019), destacándose el uso de las especies *Ganoderma lucidum*, *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor* (Attias y cols. 2020), debido a que poseen enzimas extracelulares capaces de degradar celulosa y lignina (Padinjakkara y cols., 2019), moléculas presentes en una gran variedad de desechos agroindustriales como la paja, aserrín o algodón (Ghazvinian y cols., 2019; Joshi y cols., 2020). Estos sustratos son preferidos por sobre otros, ya que además de sus bajos costos, su utilización contribuye a la remoción y manejo de estos desechos de forma sustentable. Este último aspecto es relevante ya que estos desechos tienen un importante efecto en diversos países en términos ambientales y económicos, llegando incluso a tener implicancias en la salud de las comunidades aledañas al sitio de producción (Sundarraaj y Ranganathan, 2018). Además, se ha descrito que este tipo de hongos presenta una mayor abundancia de quitina al crecer en sustratos ricos en celulosa, lo que le brinda una mayor rigidez al micelio y, por lo tanto, al biomaterial final (Haneef y cols., 2017).

Los biomateriales de micelio han emergido desde las áreas del diseño, arquitectura y biología (Attias y cols., 2020), y tienen por objetivo generar alternativas sustentables a materiales cuyos procesos generan diversos contaminantes. Algunos ejemplos de esto, son la generación de CO₂ para el caso del hormigón (Jones y cols., 2020) y la utilización de metales pesados en tratamientos tales como el curtido de cueros en la industria de la confección de vestimentas (Tonetti e Innocenti, 2009; Deeg y cols. 2017). Las consecuencias asociadas a estas problemáticas son patentes en todo el mundo, destacándose particularmente el caso de China, cuyo creciente desarrollo económico e industrial en áreas relacionadas a la producción de cemento y otros

materiales similares genera cerca del 40% de las emisiones industriales anuales de CO₂ del país (Chan y Yao, 2008; Han, 2012).

En esta necesidad de soluciones innovadoras y amigables con el medio ambiente, diversas patentes relacionadas a biomateriales basados en la utilización de hongos han sido solicitadas en distintas regiones del mundo y con aplicaciones en áreas como la industria automotriz, industria textil, embalaje o *packaging*, entre otros (Cerimi y cols., 2019). La mayoría de estas patentes han sido solicitadas por la empresa norteamericana *Ecovative* (<https://ecovativedesign.com/>), la cual se especializa en el desarrollo de tecnologías y materiales basados en el uso de micelio para ser utilizados como embalaje, aislantes térmicos, tejidos de conducción eléctrica para circuitos, biorremediadores de contaminantes, entre otros (Justia Patents, 2020).

1. Biomateriales de micelio

Tal como se puede ver en la Figura 1, la metodología de elaboración de estructuras y objetos a partir de micelio se basa en procesos propios de la biofabricación (Jones y cols., 2017; Rodriguez, 2017; Karana, 2018; Fuentes y Rodriguez, 2019; Joshi y cols., 2020) y otros que son comunes en el cultivo de hongos comestibles (Padmavati y Pradesh, 2018). Estos procedimientos pueden ser llevados a cabo a pequeña escala, en recintos domésticos y sin la necesidad de implementar una infraestructura mayor (Imtiaj y Rahman, 2008). En general, el procedimiento consiste en la inoculación de un sustrato lignocelulósico a partir de micelio en formato *spawn*. Este último, corresponde a un sustrato granuloso como arroz o trigo, sobre el cual se inocula el micelio de la cepa de interés a partir de medios de cultivo en placa y que permite reproducir la biomasa fúngica para inocular otros sustratos en mayor volumen, siendo cada grano un núcleo

desde el cual el micelio comienza a colonizar (Stamets, 1993). Una vez que este sustrato lignocelulósico es colonizado, este se fragmenta para ser introducido en un molde, etapa tras la cual el micelio, logra reconstituirse en base al principio de la anastomosis (Raudaskoski, 2015). Finalmente, la estructura obtenida se somete a un proceso de horneado para esterilizarla, deteniendo el crecimiento del hongo e impidiendo una temprana degradación, y también para deshidratar el material, permitiendo estabilizar sus propiedades (ver Figura 1).

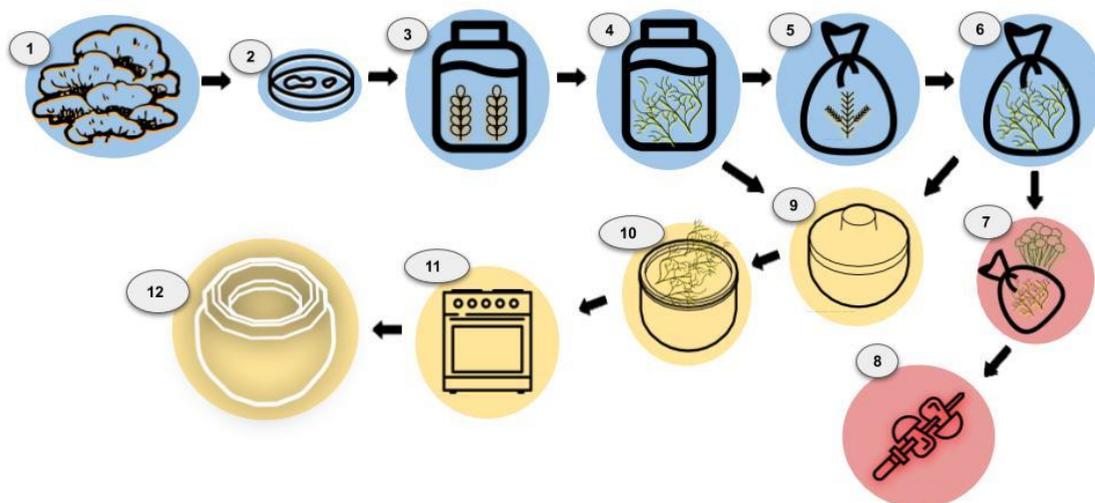


Figura 1. Diagrama de flujo de elaboración propia del proceso de biofabricación (amarillo) en comparación al proceso de cultivo de hongos comestibles (rojo). En azul se encuentran las etapas comunes para ambos procesos. 1) Obtención de un cuerpo fructífero para la reproducción de su biomasa 2) Toma de biopsia de los cuerpos fructíferos para su siembra en un medio de cultivo sólido. 3) Una vez que el medio ha sido colonizado, este se utiliza para inocular un sustrato de mayor escala llamado *spawn* o *semilla*, que consiste en un grano rico en carbohidratos de fácil absorción para el hongo, como arroz, trigo o centeno. 4) Una vez que se colonizan todos los granos, cada uno de estos funciona como un núcleo de crecimiento para inocular un sustrato final. 5) Inoculación de bolsa con sustrato final. 6) Cuando el sustrato es colonizado, se diferencia el proceso de cultivo de hongos comestibles y el de biofabricación. 7) En el primer caso, sobre el sustrato colonizado se induce la fructificación de setas. 8) Finalmente, se cosechan los hongos para su consumo. 9) En el proceso de biofabricación, el sustrato colonizado se fragmenta y se deposita en un molde. 10) El molde se incuba hasta que el micelio logra reconstituirse. 11) Luego, se aplica un proceso de horneado para deshidratar el material y esterilizarlo. 12) Finalmente, se obtiene un biomaterial de micelio con estructura definida. Una variante en el proceso es inocular el sustrato a partir de *spawn* del paso 4 en el molde del paso 9 para evitar los pasos 5 y 6, con la desventaja de que el control sobre el micelio y las condiciones de esterilidad en un molde son menores que en un sustrato en bolsa.

El estudio de las características y posibilidades de los biomateriales basados en micelio es incipiente. Desde las áreas del diseño y la arquitectura, se han explorado las posibilidades de estos materiales a través de una experimentación intuitiva más que científica, debido al limitado acceso al conocimiento científico y al escaso diálogo entre disciplinas científicas y artísticas (Attias y cols., 2020). Considerando estas dificultades, dichas áreas se han embarcado en la generación y aplicación de metodologías que permitan la aproximación al estudio de nuevas materialidades. Entre éstas, se destaca la aplicación de la metodología Diseño Conducido por el Material (Karana y cols., 2015) al caso de materiales de micelio (Karana y Camere, 2018), la cual busca generar una propuesta de diseño a partir de la experiencia que genera el encuentro y la interacción con el material. Desde el área de la ciencia de los materiales se han estudiado las características físicas y estructurales de estos materiales, donde se ha encontrado que poseen propiedades similares a espumas utilizadas como sellantes y aislantes (Jones y cols., 2020), propiedades ignífugas y capacidad de aislación térmica (Jones y cols., 2018 a) y acústica (Pelletier y cols., 2013).

A pesar de dichos esfuerzos encabezados principalmente por áreas que utilizan metodologías relacionadas al arte, las principales iniciativas generadas por empresas relacionadas al rubro de los biomateriales (*Ecovative*, *Mycoworks* y *MOGU*), están enfocadas al desarrollo y comercialización de sus productos, cuyas técnicas y conocimientos asociados a la generación de materiales tienen un carácter hermético y difuso debido a las patentes asociadas y sus intereses industriales (Attias y cols., 2020).

2. Laboratorio de Biofabricación FADEU

En el año 2017 nace el Laboratorio de Biofabricación (BioFab) de la Facultad de Arquitectura, Diseño y Estudios Urbanos (FADEU) de la Pontificia Universidad Católica de Chile, cuyo trabajo interdisciplinario se centra en el uso de organismos vivos para la generación de nuevas materialidades (Anexo, Figura 1), así como en el desarrollo de tecnologías libres y de código abierto. De esta forma, el laboratorio busca que el conocimiento y las tecnologías puedan tener un desarrollo a nivel local, sustentable, colaborativo y en estrecho contacto con la ciudadanía. Con esta premisa y a comienzos del año 2018, el equipo del laboratorio realizó una salida a terreno donde se recolectaron y aislaron diversos hongos descomponedores de madera del Parque Natural Karukinka (Región de Magallanes, Chile) con el objetivo de explorar la riqueza fúngica local y su posible aplicación en biofabricación. De esta forma, estos hongos pasaron a ser parte del cepario del laboratorio.

3. Monumento Abierto

Durante los primeros meses del primer semestre del año 2019 se comenzó a desarrollar en el laboratorio el proyecto Monumento Abierto (MA), el cual fue propuesto como una obra arquitectónica de gran escala construida a partir de ladrillos de micelio (Anexo, Figura 2). Esta se presentaría a finales del año 2019 en la 14° Bienal de Artes Mediales de Santiago, evento de exposiciones artísticas que se desarrollaría bajo una convergencia entre arte y ciencia, como respuesta a la necesidad de afrontar desde una perspectiva interdisciplinaria algunas de las múltiples problemáticas con las que se enfrenta la humanidad (Corporación Chilena de Artes y Electrónica, 2019), tales como el cambio climático (Jena y Behera, 2017), la sobreexplotación de recursos naturales

(Lampert, 2019), entre otras. Teniendo en cuenta lo anterior, la obra se planteó como una interpelación a las formas de producción y utilización de los materiales de construcción convencionales. Además, por un fondo adjudicado a mediados del mismo año desde el Ministerio de Obras Públicas (MOP), la obra se presentaría en la COP25 en diciembre de 2019.

En términos arquitectónicos, el proyecto tomó como referencia la obra *Hy-Fi* realizada por David Benjamin el año 2014, la cual consistió en una torre de gran escala construida a partir de 10.000 ladrillos de micelio y que fue instalada en el espacio de exposiciones del Museo de Arte Moderno de Nueva York MoMA PS1 (<https://www.moma.org/ps1>). Esta obra fue encomendada al autor por el museo y la producción de los ladrillos fue tercerizada a la empresa *Ecovative* (Benjamin, 2017). A diferencia de este proyecto, MA planteó la liberación del conocimiento generado durante el desarrollo de la obra, con la finalidad de aportar información de libre acceso al estado del arte en torno a la biofabricación en gran escala. Este propósito se enmarca en el contexto de diversas corrientes que han surgido en las últimas décadas y que promueven la generación de conocimiento abierto tales como *Open Science* (Vicente-Saez y Martínez-Fuentes, 2017), *Open Source* (Shahrivar y cols., 2018), *Open Access* (García-Peñalvo, 2020) y *Open Data* (Chauvette y cols., 2019). Estas iniciativas tienen como principal objetivo, el libre acceso a información académica, protocolos, métodos, bases de datos, códigos de *software* y *hardware*, entre otros. Evidencia de la fuerza de estos movimientos es el creciente uso de plataformas de liberación de literatura científica tales como *Sci-Hub* y *LibGen* (Himmelstein y cols., 2018; González-Solar y Fernández-Marcial, 2019), revistas de publicación de acceso abierto como *SciELO*

(Packer, 2009), repositorios abiertos de protocolos como *protocols.io* (Teytelman y cols., 2016) y repositorios de *software-hardware* abierto (Powell, 2012).

Considerando la variedad de aristas de este proyecto, MA se presentó como un desafío que debía abordarse desde una perspectiva multidisciplinaria. Por ello, se formaron equipos de trabajo para el área de diseño, arquitectura, producción y biotecnología. Durante el primer semestre del año 2019, el equipo de biotecnología junto al equipo de diseño, trabajaron principalmente en explorar las posibilidades de la elaboración de ladrillos de micelio con algunas cepas del cepario del Parque Natural Karukinka mientras que, durante el segundo semestre, se trabajó en la instauración de una línea de producción de ladrillos en la fábrica Hongos de Chile. Debido a diversas problemáticas, la cantidad total de ladrillos generados en este proceso fue de 215 (Anexo, Figura 3.A), correspondiente al 2,2% de los ladrillos necesarios para armar la obra. Esto, en adición a que la COP25 se canceló por medidas del gobierno ante la crisis social de Chile, significó que la obra no se llevara a cabo. Algunos de los ladrillos obtenidos, se utilizaron para una exposición en la Aparición Infinita del Museo del Hongo en el contexto de la Bienal de Artes Mediales en diciembre del año 2019 (Anexo, Figura 3.B).

A pesar de que el conocimiento generado durante el desarrollo de MA es amplio, algunos procesos que se llevaron a cabo necesitaban ser replanteados. En particular y desde el área de la biotecnología, la necesidad de sistematizar y protocolizar el trabajo exploratorio llevado a cabo durante el primer semestre de dicho año se hizo patente.

4. Antecedentes

Los primeros trabajos de MA contemplaron la exploración de las posibilidades de la elaboración de ladrillos de micelio con dos cepas del cepario del Parque Natural Karukinka: KRK27 y KRK78, las que se seleccionaron debido a que presentaban un mayor crecimiento de colonia en placas con medio de cultivo PDA respecto a otras cepas del laboratorio (Anexo, Figura 4). De acuerdo a la identificación morfológica a partir de los respectivos cuerpos fructíferos ratificada por la investigadora de la Fundación Fungi, Daniela Torres, estas cepas corresponden a *Trametes versicolor* y *Bjerkandera adusta* respectivamente, ambos basidiomicetos descomponedores de madera de pudrición blanca. Dichos hongos han experimentado un creciente interés desde distintas áreas más aplicadas, debido a que se han descrito propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenas de gran interés médico para *T. versicolor* (Pop y cols., 2018), así como también se ha reportado la capacidad de biorremediar contaminantes hidrofóbicos del suelo para el caso de *B. adusta* (Quintero y cols., 2007). De esta forma, en paralelo a la biofabricación, el desarrollo de metodologías que permitan estudiar y reproducir la biomasa de estos hongos, podría favorecer otras aplicaciones debido a su gran potencial biotecnológico.

Respecto a la metodología de trabajo, ésta tuvo un carácter lineal (Anexo, Figura 5), contemplando la elección de las cepas a utilizar, la realización de pruebas de crecimiento en sustratos, pruebas de producción de ladrillos, pruebas mecánicas y finalmente una producción en gran escala. De este trabajo, se obtuvo que las cepas KRK27 y KRK78 presentaban un crecimiento notable en paja (Anexo, Figura 6), sin embargo, solo se realizaron pruebas con las dimensiones de un ladrillo con la cepa KRK78, donde se obtuvo estructuras endebles que no lograban ser manipuladas sin

romperse (Anexo, Figura 7). También se observó que la cepa KRK78 presentaba un grado de colonización significativamente menor respecto a KRK27 al crecer en el formato *spawn*, lo cual fue evaluado de acuerdo a la coloración blanca de los granos (Anexo, Figura 8.A). Uno de los tratamientos que se aplican en el proceso de producción de *spawn*, es la agitación del contenido para que los granos colonizados se dispersen en el recipiente y puedan colonizar granos que no han entrado en contacto con el micelio (San Antonio, 1971; Sánchez, 2010). Estas observaciones sugirieron que las diferencias observadas en la colonización del sustrato se podrían deber a que la cepa KRK78 experimenta un estrés mecánico por la agitación, lo que repercutiría directamente en su tasa de crecimiento y porcentaje de colonización de sustrato. Dicha observación también fue realizada por los colaboradores de la empresa Micosecha (Anexo, Figura 8.B), dejando en evidencia un comportamiento no reportado hasta la fecha.

5. Sistematización

La elección de cepas fue una decisión tomada en base a la observación de que las cepas KRK27 y KRK78 tenían un crecimiento en placa superior a otros hongos, por lo cual se hizo necesario sistematizar este proceso de forma cuantitativa. Además, el crecimiento de los hongos en *spawn* fue un aspecto poco abordado en términos de experimentación, por lo que era necesario comparar y evaluar, mediante una metodología rigurosa, la colonización del grano en este formato de crecimiento, tomando en cuenta la observación de que el *spawn* de KRK78 perdía vigor de crecimiento al ser sometido al estrés mecánico de agitación. Considerando los aspectos mencionados anteriormente, el presente trabajo busca sistematizar las pruebas experimentales de

dos módulos del proceso de obtención de ladrillos de micelio (Figura 1), los que corresponden a crecimiento de micelio en placa y en *spawn*.

6. Objetivos

Objetivo general

- Sistematizar las pruebas de crecimiento en medio de cultivo en placa y *spawn* para las cepas fúngicas silvestres KRK27 y KRK78 en el contexto del desarrollo de biomateriales de micelio.

Objetivos específicos

- Analizar metodologías de cultivo de hongos que pueden ser aplicadas a los procesos de biofabricación de ladrillos de micelio.
- Aplicar metodologías de análisis digital de imágenes para protocolizar la prueba de crecimiento en placa y observación directa de registros fotográficos para la prueba de crecimiento en *spawn* utilizando las cepas silvestres KRK27 y KRK78.
- Evaluar las metodologías utilizadas para la protocolización de pruebas de crecimiento mediante análisis cuantitativo para el experimento en placas y mediante análisis cualitativo para el experimento en *spawn*.
- Analizar pertinencia de las metodologías aplicadas como aporte al estado del arte de los procesos utilizados en la biofabricación de ladrillos de micelio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

- Placas Petri con micelio de los hongos KRK27, KRK78, KRK252, KRK283 y *Pleurotus ostreatus*.
- Placas petri de 90 mm x 15 mm con medio PDA (PhytoTech Lab)
- Bisturís quirúrgicos N°10
- Cabina de flujo laminar con ampolleta UV Clase II (Biobase)
- Escaner Epson Perfection v19
- Incubadora 50 L (MMM Group)
- Parafilm
- Regla de 10 cm.
- Trigo candeal crudo comercial
- *Mushbags* con filtro HEPA (High-Efficiency Particulate Air)
- Masking tape
- Foil de aluminio
- Coladores
- Selladora térmica con pedestal (Granttech)
- Cocina de inducción FDV Professional
- Olla de inducción de 8 litros
- Autoclave de 20 litros
- Cámara de celular Huawei Y6 2019 de 13 Megapíxeles.

1. Crecimiento en placa

Se compararon las tasas de crecimiento radial en placas con medio de cultivo sólido de las especies KRK27 y KRK78 respecto de la cepa comercial *Pleurotus ostreatus* y otras dos especies silvestres del Parque Natural Karukinka (KRK252 y KRK253). La especie *P. ostreatus* se incorporó debido a que, al ser una cepa comercial, existe un amplio conocimiento respecto a su biología y sus dinámicas de crecimiento en la literatura, permitiendo generar una comparación respecto a las cepas silvestres.

1.1 Cultivos de hongos

Los cultivos en medio sólido de las cepas de código KRK se obtuvieron como subcultivo de placas colonizadas por los respectivos hongos del cepario del laboratorio BioFab. Estos, se aislaron a partir de cuerpos fructíferos de hongos basidiomicetes descomponedores de madera recolectados en el Parque Natural Karukinka. Los cultivos en medio sólido de la especie *P. ostreatus*, se obtuvieron como subcultivo de placas con micelio aislado desde el tejido de un cuerpo fructífero comercial de la empresa Frutos de Lonquén (<https://www.frutosdelonquen.cl>). Esto, fue realizado como contribución del Laboratorio de Trabajos Prácticos de Microbiología de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

1.2 Preparación de placas e inoculación

Se inocularon placas con medio de cultivo PDA con micelio de las cepas KRK27, KRK78, KRK283, KRK252 y *P. ostreatus* en triplicado. La inoculación se realizó mediante el depósito de trozos de gel de aproximadamente 1 cm² sobre el centro de placas con PDA. Los geles se cortaron con bisturís quirúrgicos a partir de placas con

micelio de las distintas cepas. Las placas se sellaron con papel arafilm y se dejaron en una incubadora a 25 °C en oscuridad durante 17 días.

1.3 Registro de placas

El registro del crecimiento fúngico se realizó mediante el escaneo de la base de cada placa, incorporando en cada toma de imagen una regla de 10 cm de referencia para estandarizar la escala de medida al realizar el análisis digital.

1.4 Análisis digital

Los registros obtenidos se procesaron utilizando el software ImageJ. Cada imagen se transformó de un formato RGB a un formato 8-bit (blanco y negro) y se configuró la escala tomando como referencia 1 cm de la regla incorporada en la imagen. Luego, se analizó cada placa utilizando la herramienta *Threshold*, la cual permite generar un contraste entre el fondo de un objeto y el objeto, en este caso el micelio. Finalmente, se utilizó la herramienta *Analyze image* para medir la superficie del micelio a partir del contraste generado.

1.5 Procesamiento de datos

El área de cada colonia se asumió como circular (Lappa y cols., 2015), por lo que su valor se consideró como $(\pi D^2)/4$, donde D corresponde al diámetro de la colonia. De esta forma, a partir de las mediciones de superficie obtenidas de los triplicados de cada cepa, se obtuvieron los respectivos diámetros de colonia. Considerando que el crecimiento radial tiene un comportamiento lineal (Moore, 2011), a cada valor de diámetro obtenido se le restó el valor de diámetro a tiempo 0 para corregir el error por el tamaño del inóculo. Los valores de diámetro se procesaron utilizando el software

GraphPad Prism, aplicando la regresión sinusoidal de Gompertz con la modificación de Zwietering (Zwietering y cols., 1990; Yin y cols., 2003). A partir de la regresión aplicada a los distintos datos, se construyeron curvas de crecimiento sinusoidal para cada hongo junto con la obtención de los parámetros de la curva.

La ecuación de la regresión de Gompertz con la modificación de Zwietering es la siguiente:

$$Y(t) = Ae^{-e^{\frac{M \cdot 2,718282}{A}(l-t)+1}} \quad (1)$$

Donde Y(t) corresponde al incremento del diámetro que depende del tiempo t; A es el valor máximo de diámetro al que converge la curva asintóticamente; l es el valor del tiempo t en el que finaliza la fase de latencia de la curva y donde se inicia el crecimiento asintótico, conocido también como tiempo lag; M corresponde a la pendiente o tasa de crecimiento absoluta obtenida a partir de la tangente a la curva asintótica cuando t=l y el factor numérico que multiplica a M es el número de Euler (Tjørve y Tjørve, 2017).

1.6 Análisis estadístico

Al aplicar el modelo de Gompertz sobre los datos de incremento radial para cada cepa, el software GraphPad ha entregado los parámetros respectivos de la ecuación (A, m y l). El programa, además, ha entregado las desviaciones estándar para cada parámetro. Con los valores de cada parámetro, las respectivas desviaciones estándar y tomando en cuenta de que se trabajó cada cepa en triplicado (n=3), se realizó un análisis ANOVA unidireccional en Graphpad mediante un test de Tukey con un 95% de confianza

($p < 0,05$) para evaluar si existen diferencias significativas entre las cepas fúngicas para cada parámetro.

2. Crecimiento en *spawn*

Se evaluó el crecimiento de hongos KRK27, KRK78 y *P. ostreatus* en *spawn*, aplicando el procedimiento de agitación del sustrato en estos durante el periodo de incubación. Los *spawn* se prepararon siguiendo una metodología de producción de *spawn* en bolsas llamadas *mushbag*, las cuales se utilizan regularmente en procesos de producción de *spawn* industrial (Ogden y Prowse, 2004).

2.1 Preparación de sustrato de *spawn*

Para la producción de *spawn*, se siguió la metodología del esquema de la figura 2.

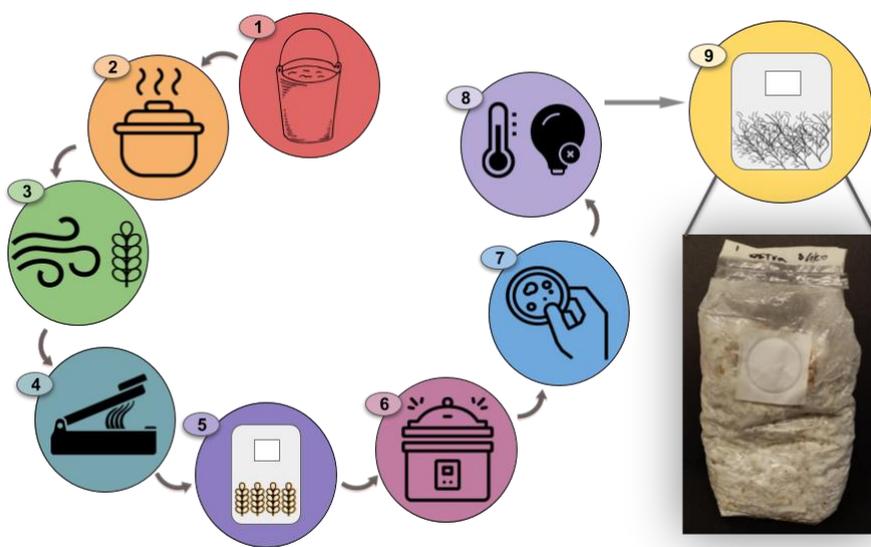


Figura 2. Proceso de producción de *spawn* en *mushbags*. 1) Remojo del grano utilizado. 2) Cocción del grano. 3) Secado del grano. 4) Incorporación del trigo al interior de las bolsas y sellado de estas. 5) Preparación de bolsas para ser ingresadas al autoclave. 6) Autoclavado de las bolsas. 7) Inoculación de las bolsas en un ambiente estéril. 8) Incubación a 25°C y en ausencia de luz. 9) Evaluación del crecimiento del hongo en los *spawn*.

Se remojaron 10 kg de trigo candeal en agua por 12 horas. Tras el remojo, se pesó el trigo, observándose que su peso aumentó al doble de su peso seco. Luego, se procedió a cocer el grano utilizando una cocina eléctrica de inducción FDV Professional a 80°C y potencia 4 por 1 hora. Tras la cocción, se removió el exceso de agua utilizando coladores y se depositó el grano sobre una superficie metálica con papel de secado para facilitar el proceso de remoción de humedad durante 20 minutos, tiempo tras el cual el grano alcanzó un porcentaje de humedad cercano al 50% recomendado (Stamets, 1993). Este porcentaje, se calculó dividiendo la razón entre la diferencia del peso húmedo tras la cocción y el peso seco del trigo, sobre el peso húmedo tras la cocción. Tras el proceso de secado, se incorporó 1 kg de trigo por bolsa *mushbag* de 2L de capacidad (25x10x8 cm³). Luego, las bolsas se prepararon de acuerdo al esquema de la figura 3 para ser ingresadas al autoclave (Figura 4). Las bolsas se autoclavaron por 40 minutos a 121°C y 103 kPa (Moreaux, 2017). Una vez autoclavadas las bolsas, estas se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante la noche para ser inoculadas al día siguiente.

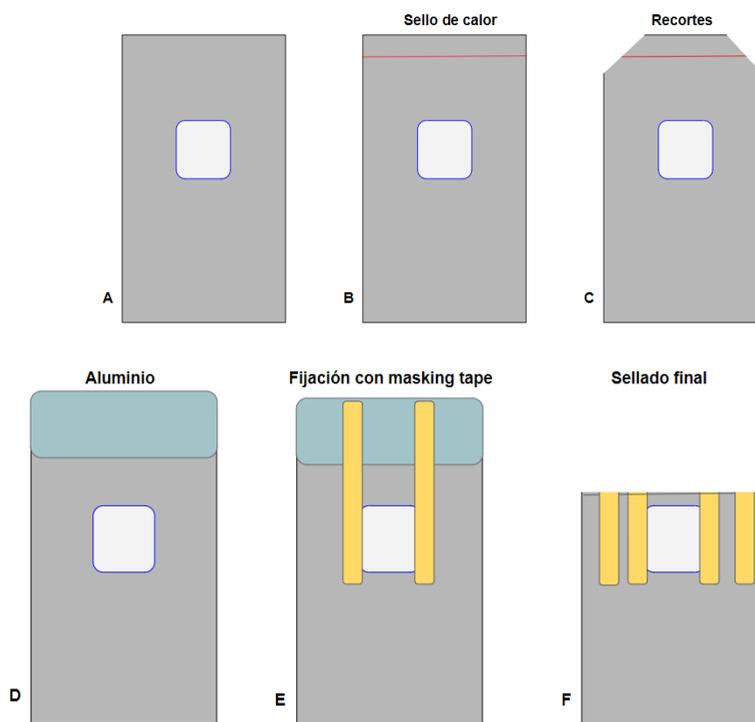


Figura 3. Proceso de preparación de *mushbags*. A) *Mushbag* con trigo en su interior. B) En primer lugar se realizó un sellado térmico con una selladora de calor en la zona superior de la bolsa. C) Se recortaron las puntas de los bordes superiores de la bolsa con la finalidad de facilitar el intercambio gaseoso al interior del autoclave de forma adicional al filtro incorporado en la misma bolsa. D) La zona superior con recortes se cubrió con papel aluminio. E) El aluminio se fijó a la bolsa utilizando *masking tape*. F) Finalmente la *mushbag* se plegó a la mitad para disminuir el volumen de la bolsa y se fijó con *masking tape*.



Figura 4. *Mushbags* con trigo dispuestas para la esterilización por autoclave.

2.2 Inoculación de *spawn*

En el interior de la cabina de flujo laminar, se inocularon 6 *mushbags* por cada hongo (KRK27, KRK78 y *P. ostreatus*). Además, se dejaron dos *mushbags* sin inocular a modo de control negativo de crecimiento de micelio. Para la inoculación, se realizaron recortes en las *mushbag* en la zona donde se aplicaron los sellos de calor utilizando una tijera y se incorporó en el interior de estas, un tercio de gel PDA con micelio de cada cepa incubadas en placas de 9 cm con una superficie total de 58 cm² (aproximadamente 19 cm² por cada tercio de placa). Posteriormente, las *mushbags* se sellaron con *masking tape* para sacarlas de la cabina, tras lo cual se les aplicó un doble sello de calor utilizando la selladora térmica. Finalmente, los *spawn* se dejaron en incubación a temperatura ambiente, donde se registró un rango de temperatura que varió desde los 25 a los 28 °C durante el periodo de incubación.

2.3 Tratamiento y registro de *spawn*

Los *spawn* se dejaron incubando por 12 días, tiempo tras el cual el micelio de todas las cepas colonizó la totalidad del sustrato. Durante este periodo, se realizó un registro

fotográfico a los 3, 5, 7, 9 y 12 días de incubación en todos los perfiles de las bolsas y en las contaminaciones o focos de crecimiento de las respectivas cepas. Además, se aplicó el procedimiento de agitación a los 5, 7 y 9 días sobre 3 de los 6 *spawn* de cada hongo. Este procedimiento consistió en una desfragmentación manual de los granos de trigo que se encontraban adheridos entre sí por el micelio. Luego, se agitó manualmente cada bolsa por 20 segundos (Sharma y Kumar, 2011; McCoy, 2016). Para el caso de los dos controles negativos, a uno de estos se le aplicó el procedimiento de agitación y al otro no.

El último día de experimentación (12), tras el registro fotográfico, se aplicó el procedimiento de agitación para todos los *spawn*, incluyendo aquellos que no se sometieron a agitación durante el periodo de estudio. Posterior a esto, se realizó un último registro fotográfico. Los *spawn* en los que se detectaron contaminantes durante el periodo de estudio, se desecharon el día en que se detectaron los focos de contaminación para evitar su propagación, y aquellos que presentaron contaminantes visibles en el día 12 no se agitaron y se descartaron de forma inmediata, siendo depositados en la basura común.

2.4 Análisis de registros

El análisis de las imágenes registradas se realizó mediante la observación directa, evaluando la presencia de micelio y contaminantes. Los *spawn* que no presentaron contaminaciones, se sometieron a una comparación cualitativa por contraste de imágenes antes y después de la agitación realizada el día 12 para evaluar las características del micelio.

RESULTADOS

1. Prueba de crecimiento en placa

Para la sistematización de la prueba de crecimiento en placa, se hizo un registro con un escáner del crecimiento de las cepas KRK27 y KRK78 en comparación a la cepa comercial *P. ostreatus* y las cepas silvestres KRK252 y KRK283 durante 17 días. Con este registro, se obtuvieron valores de incremento de superficie de las colonias fúngicas, y a partir de estos, se calcularon valores de incremento radial en el tiempo (Anexo, Tabla 1 para los valores y Anexo, Tabla 2 para las respectivas desviaciones estándar). Sobre estos últimos datos, se aplicó la regresión de Gompertz con la modificación de Zwietering, la cual ha sido ampliamente utilizada para graficar curvas de crecimiento de microorganismos (Tjørve y Tjørve, 2017) y crecimiento radial de colonias de hongos filamentosos (Char y cols., 2007; Altieri y cols., 2007). Con la aplicación de este modelo matemático sobre los respectivos datos, se obtuvo curvas de crecimiento para cada hongo, las que se presentan en el gráfico de la Figura 5.

Gráfico de crecimiento radial vs tiempo

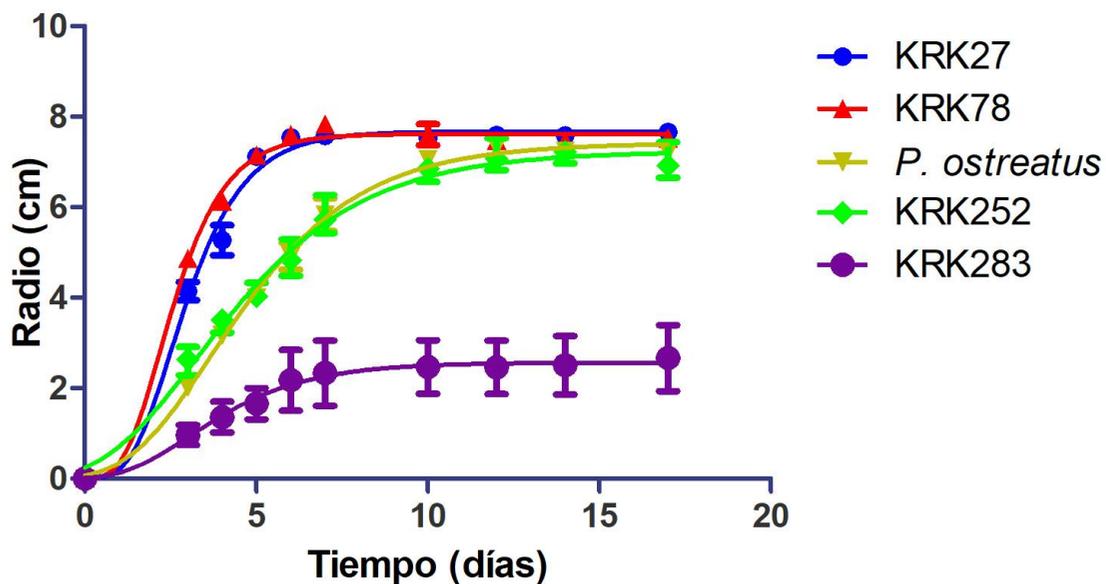


Figura 5. Gráfico de incremento de diámetro de colonia en placa con PDA respecto al tiempo. Las cepas utilizadas fueron KRK27, KRK78, KRK252, KRK283 y *P. ostreatus*. La temperatura de incubación fue de 25°C y el periodo de recolección de datos fue de 17 días.

Los valores de incremento de diámetro de colonia en el tiempo, se ajustaron de buena manera al modelo de Gompertz para todos los hongos en estudio, con valores de R^2 superiores a 0,98 a excepción de KRK283, que presentó un R^2 de 0,53 (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros de la regresión de Gompertz obtenidos a partir de las curvas de incremento radial de colonias fúngicas respecto al tiempo.

	KRK78	KRK27	<i>P. ostreatus</i>	KRK252	KRK283
M [cm/día] ^[1]	2,65 ± 0,282 <i>a</i> ^[2]	2,40 ± 0,269 <i>a</i>	1,13 ± 0,0671 <i>b</i>	0,99 ± 0,0762 <i>bc</i>	0,50 ± 0,274 <i>c</i>
l [día] ^[3]	1,13 ± 0,232 <i>a</i>	1,34 ± 0,240 <i>a</i>	1,28 ± 0,202 <i>a</i>	0,58 ± 0,303 <i>a</i>	1,16 ± 1,669 <i>a</i>
A [cm] ^[4]	7,62 ± 0,0610 <i>a</i>	7,67 ± 0,0916 <i>ab</i>	7,42 ± 0,106 <i>ab</i>	7,24 ± 0,140 <i>b</i>	2,57 ± 0,261 <i>c</i>
R ² ^[5]	0,99	0,98	0,99	0,98	0,53

[1] M: Tasa de crecimiento absoluta obtenida a partir de la tangente a la curva asintótica cuando t=l.

[2] Los valores de cada parámetro (M, l y A) aparecen acompañados de las respectivas desviaciones estándar, obtenidas a partir de la aplicación del modelo de Gompertz a los datos de la tabla del anexo 1. Además, se incorporaron letras al término de cada valor, las cuales representan los resultados obtenidos del análisis ANOVA con el test de Tukey a un porcentaje de confianza del 95% (p<0,05). Los valores con letras idénticas en cada fila, no presentaron diferencias significativas (p>0,05, ver tablas de anexo 3, 4 y 5) y los valores con letras distintas, presentaron diferencias significativas (p<0,001 entre valores con letras en cursiva y p<0,05 entre valores con las letras subrayadas).

[3] l: Valor del tiempo t en el que finaliza la fase de latencia de la curva y donde se inicia el crecimiento asintótico o conocido como tiempo lag.

[4] A: Valor máximo de diámetro al que converge la curva asintóticamente.

[5] R²: Coeficiente de determinación de las curvas.

A partir de las curvas de crecimiento de cada hongo, se obtuvieron los parámetros de la ecuación de Gompertz con las respectivas desviaciones estándar (Tabla 1). Con los valores de cada parámetro, las respectivas desviaciones estándar y tomando en cuenta que los cultivos de cada cepa para este experimento se hicieron en triplicado, se realizó un análisis ANOVA incorporando un test de Tukey con un porcentaje de confianza del 95% (p<0,05). Este análisis se hizo con la finalidad de evaluar si existen diferencias significativas para cada parámetro entre las cepas fúngicas utilizadas. Los valores de p obtenidos a partir del test de Tukey para la comparación entre las cepas para los parámetros m, A y l, se encuentran en las tablas del Anexo 3, 4 y 5 respectivamente. En la tabla 1, se incorporan de forma resumida los resultados de las diferencias significativas entre cepas para cada parámetro. De forma adicional, se

graficaron los valores de los parámetros para cada especie en triplicado (Figuras 6, 7 y 8). En estos gráficos, se resaltaron las diferencias significativas existentes entre las cepas fúngicas para cada parámetro, en base a los valores de p obtenidos en el test de Tukey. De acuerdo al análisis ANOVA, se encontraron diferencias significativas entre las cepas de estudio para el parámetro “ m ” y “ A ”, ambos con un $p < 0,0001$ considerando un porcentaje de confianza del 95% ($p < 0,05$).

Gráfico de valores de “ m ” con test de Tukey para ANOVA ($p < 0,05$)

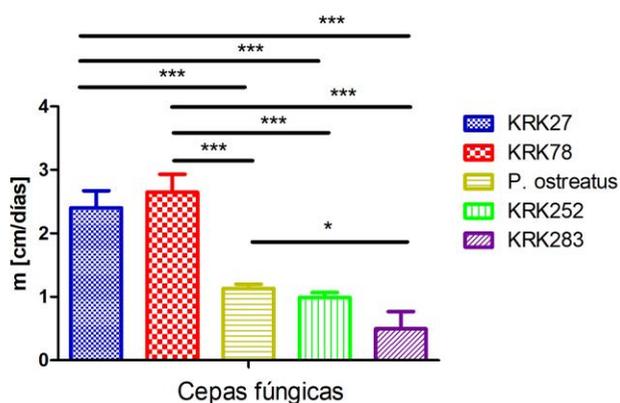


Figura 6. Gráfico con valores del parámetro “ m ” de la ecuación de Gompertz para las cepas fúngicas KRK27, KRK78, *P. ostreatus*, KRK252 y KRK283. El análisis ANOVA entregó un $p < 0,0001$ para este parámetro, indicando que existen diferencias significativas entre los grupos de estudio. Se incluyeron las barras de error para cada cepa y se destacaron con una línea horizontal las diferencias significativas entre cepas, entregadas como resultado del test de Tukey con un 95% de confianza ($p < 0,05$). Los asteriscos representan los valores de p : ***= $p < 0,001$ | *= $p < 0,05$.

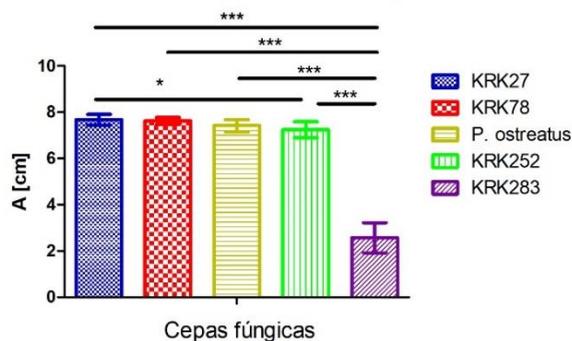
Gráfico de valores de "A" con test de Tukey para ANOVA ($p < 0,05$)

Figura 7. Gráfico con valores del parámetro "A" de la ecuación de Gompertz para las cepas fúngicas KRK27, KRK78, *P. ostreatus*, KRK252 y KRK283. El análisis ANOVA entregó un $p < 0,0001$ para este parámetro, indicando que existen diferencias significativas entre los grupos de estudio. Se incluyeron las barras de error para cada cepa y se destacaron con una línea horizontal las diferencias significativas entre cepas, entregadas como resultado del test de Tukey con un 95% de confianza ($p < 0,05$). Los asteriscos representan los valores de p : ***= $p < 0,001$ | *= $p < 0,05$.

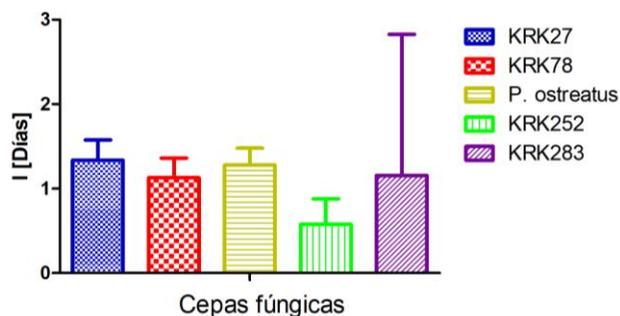
Gráfico de valores de "I" con test de Tukey para ANOVA ($p < 0,05$)

Figura 8. Gráfico con valores del parámetro "I" de la ecuación de Gompertz para las cepas fúngicas KRK27, KRK78, *P. ostreatus*, KRK252 y KRK283. El análisis ANOVA entregó un $p > 0,05$ para este parámetro, indicando que no existen diferencias significativas entre los grupos de estudio. Se incluyeron las barras de error para cada cepa.

A partir de los valores de la tabla 1, se obtuvo que las cepas con mayores tasas de crecimiento absolutas “m” corresponden a KRK78 y KRK27, seguidas de *P. ostreatus*, KRK252 y finalmente KRK283. De acuerdo al gráfico de la figura 6, no existen diferencias significativas entre KRK27 y KRK78, sin embargo, estas dos cepas sí presentaron diferencias significativas respecto a las cepas KRK252, *P. ostreatus* y KRK283 ($p < 0,001$). De esta forma, la cepa KRK27 posee una tasa de crecimiento radial que es 2,1 veces mayor a la de *P. ostreatus*, 2,4 veces mayor a la de KRK252 y 4,8 veces mayor a la de KRK283. La cepa KRK78 posee una tasa de crecimiento radial que es 1,1 veces mayor a la de KRK27, 2,3 veces mayor a la de *P. ostreatus*, 2,7 veces mayor a la de KRK252 y 5,3 veces mayor a la de KRK283. No se encontraron diferencias significativas entre *P. ostreatus* y KRK252, y tampoco entre KRK252 y KRK283, pero sí entre *P. ostreatus* y KRK283.

Por otro lado, debido a que el valor de diámetro de colonia en el día 0 fue restado a todos los valores de diámetro de colonia tomados durante el periodo de estudio, los valores de A de la tabla 1 no representan el máximo diámetro de crecimiento, que corresponde a la capacidad máxima de la placa (8,5 cm). Al observar el crecimiento de las placas el último día de registro (Figura 9), se tiene que sólo las cepas KRK27, KRK78 y *P. ostreatus* colonizaron la totalidad de las placas. Por su parte, la cepa KRK252 no colonizó la totalidad de las respectivas placas, sin embargo, se acercó de forma notable al borde de estas. Además, KRK283 exhibió el menor de los crecimientos, lo cual fue expresado en que se encontraron diferencias significativas entre los valores de A para cada cepa respecto a KRK283 con un $p < 0,001$ (Figura 7). La única diferencia significativa detectada entre las otras cepas, fue entre KRK27 y KRK252 con un $p < 0,05$. De acuerdo al gráfico de la figura 5, el crecimiento para todas las cepas en el último día

de registro corresponde al *plateau* de las respectivas curvas. De esta forma, se estima que aquellas cepas que no colonizaron la totalidad de las placas alcanzaron una fase estacionaria de crecimiento en las condiciones en que se encontraban durante los últimos días de registro.

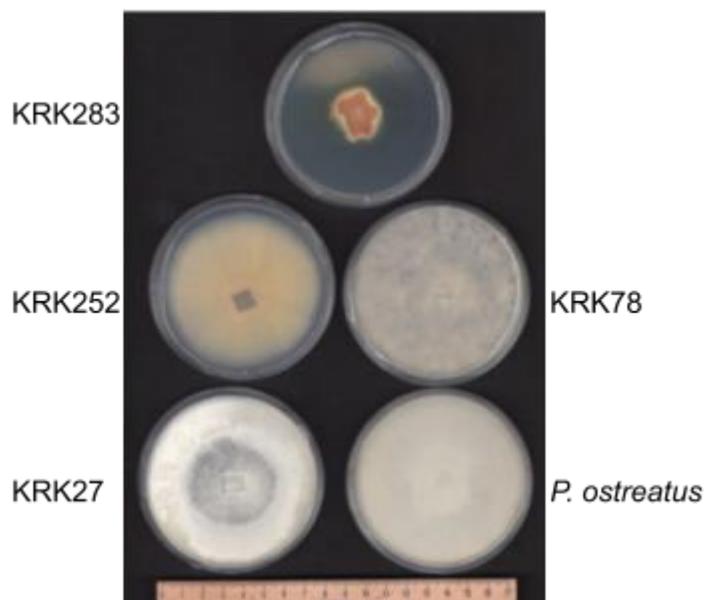


Figura 9. Colonización de KRK27, KRK78, KRK283, KRK252 y *P. ostreatus* en placas con PDA al día 17 de registro. Estas fueron incubadas a 25°C durante el periodo de estudio.

Finalmente, los hongos KRK78, KRK2, KRK283 y *P. ostreatus* no presentaron diferencias significativas en los valores de *I*, con un $p > 0,05$ (Tabla Anexo 5 y Figura 8). Por su parte, la cepa KRK252 presentó un valor de *I* notablemente menor respecto a los otros hongos, sin embargo, este parámetro está sujeto a imprecisiones debido a la baja cantidad de datos tomados en el rango de tiempo en el que se encuentran los valores de *I* de todas las cepas (0,58-1,34 días).

2. Prueba de crecimiento en *spawn*

Para sistematizar la prueba de crecimiento en *spawn*, se realizó un registro fotográfico durante el periodo de incubación de *spawn*s con los hongos KRK27, KRK78 y *P. ostreatus*. Durante este periodo, a la mitad de los *spawn* de cada hongo se le aplicó el procedimiento de agitación y a la otra mitad no. El último día del periodo de estudio, todos los *spawn* se agitaron para ver el estado de la colonización del micelio. Los *spawn* de los tres hongos en estudio, colonizaron la totalidad del sustrato visible de las *mushbag* en un periodo de 12 días.

Durante el periodo de estudio, se presentaron diversos contaminantes de carácter fúngico, principalmente mohos verdes y negros (Anexo, Figura 9), sobre los *spawn* a los que se les aplicó el procedimiento de agitación como a los que no. Los controles negativos sometidos a los tratamientos de agitación y sin agitación presentaron contaminaciones del tipo moho verde a los días 7 y 9 respectivamente (Anexo, Figura 10). Para cuantificar las tasas de contaminación, se construyeron escalas de progreso en el tiempo con las imágenes del perfil frontal de cada *spawn* (Figura 10).

P. ostreatus Agitado

Figura 10. Escala de progreso elaborada a partir del registro fotográfico de los *spawn* agitados de *P. ostreatus* durante el periodo de estudio. Esta escala se construyó de igual forma para los *spawn* agitados y no agitados de las cepas KRK27 y KRK78. Todos los *spawn* se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad, registrándose un rango de 25-28°C.

Las escalas de progreso permitieron recopilar la información de los *spawn* que se contaminaron. Esto, en adición a los contaminantes detectados el último día de experimentación (día 12) tras la agitación realizada a todos los *spawn*, permitió elaborar un esquema comparativo para evaluar la incidencia de contaminaciones tras el periodo de estudio (Anexo, Figura 11). En las imágenes de este esquema, se observa que luego del proceso de agitación se pierde en gran medida la coloración blanca de los respectivos *spawn* debido a la fragmentación de los cúmulos de sustrato colonizado con micelio. A partir de este esquema, se elaboró una tabla con valores binarios para determinar las tasas de contaminación de cada cepa (tabla 2).

Tabla 2. Incidencia de contaminantes sobre los <i>spawn</i> de los 3 hongos que se sometieron al procedimiento de agitación y los que no durante el periodo de estudio.							
Condición		Antes de agitar (día 12) ^[1]			Después de agitar (día 12)		
Agitación durante el periodo de estudio	N° spawn	<i>P. ostreatus</i>	KRK27	KRK78	<i>P. ostreatus</i>	KRK27	KRK78
Incidencia de contaminantes ^[2]	1 ^[3]	0	1	0	0	1	0
	2	0	0	1	0	0	1
	3	1	0	1	1	1	1
% contaminación ^[4]		33	33	67	33	67	67
Sin agitación durante el periodo de estudio	N° spawn	<i>P. ostreatus</i>	KRK27	KRK78	<i>P. ostreatus</i>	KRK27	KRK78
Incidencia de contaminantes	1	1	0	0	1	0	0
	2	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	1
% contaminación		33	0	0	33	0	33
<p>[1] La incidencia de contaminantes se explicita para los <i>spawn</i> antes y después de agitar por última vez el último día de estudio (12).</p> <p>[2] La incidencia de contaminantes se determinó a partir del análisis del esquema de la figura 11 del anexo. Se atribuyó un valor de 1 en los <i>spawn</i> contaminados y un 0 a los que no.</p> <p>[3] Se incorpora las incidencias de contaminantes para los triplicados de cada hongo utilizado en la experimentación.</p> <p>[4] Los porcentajes de contaminación se determinaron a partir de la cantidad de <i>spawn</i> contaminados sobre la cantidad total de <i>spawn</i> en cada grupo de estudio (3).</p>							

A partir de los valores de la tabla 2, se tiene que hay una mayor incidencia de contaminantes en los *spawn* de las cepas KRK27 y KRK78 que se sometieron al procedimiento de agitación durante el periodo de estudio respecto a *P. ostreatus*. Esto se puede comprobar al comparar los porcentajes de contaminación de los hongos silvestres que se sometieron a la agitación durante el periodo de estudio respecto a los que no. Además, los resultados sugieren que pueden presentarse casos en los que,

aunque el micelio ha colonizado de forma completa los granos del *spawn* que están en contacto con la bolsa, en el interior pueden desarrollarse contaminantes que se hacen visibles al agitar el sustrato. Tal es el caso del *spawn* N°3 de KRK27 sometido al procedimiento de agitación y el *spawn* N°3 de KRK78 que no se sometió al procedimiento de agitación, sobre los que se detectaron contaminantes sólo cuando estos fueron agitados el último día de estudio (12).

Posteriormente, se realizó una comparación cualitativa del micelio de las réplicas de los *spawn* que no presentaron contaminantes durante el periodo de estudio. En el esquema de la Figura 11, se incorporaron imágenes representativas de los *spawn* de cada hongo. A partir de la observación de estas imágenes, se tiene que los *spawn* de KRK27 y KRK78 presentan una menor abundancia de micelio tras la agitación realizada el último día de experimentación (12). Esta observación se evidenció para los *spawn* que se sometieron al procedimiento de agitación durante el periodo de estudio, como los que no.

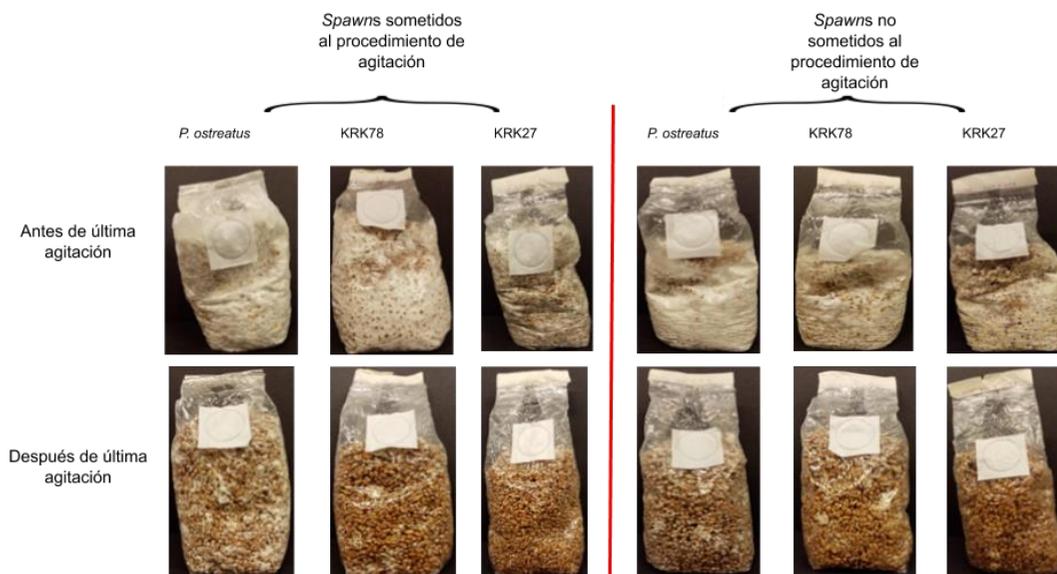


Figura 11. Imágenes de *spawns* de los distintos hongos de estudio antes y después de la agitación aplicada el último día de experimentación (12). Se presenta un contraste entre los *spawn* sometidos al procedimiento de agitación durante el periodo de estudio y los que no. Las imágenes corresponden a réplicas representativas de cada hongo.

DISCUSIÓN

1. Prueba de crecimiento en placa

La información respecto a la determinación de tasas de crecimiento de hongos filamentosos es limitada debido a la dificultad de medir la concentración de su biomasa fúngica (Tišma y cols., 2010). Esto se debe a que, a diferencia de bacterias y levaduras, este tipo de hongos posee tasas de crecimiento lentas y una composición y extensión del micelio que suele estar en constante cambio (Calam, 1969). Esto dificulta tener suspensiones homogéneas sobre las cuales realizar mediciones basadas en técnicas ópticas o titulación por conteo de colonias. Los métodos más utilizados para obtener tasas de crecimiento de hongos filamentosos corresponden a la medición del peso seco del micelio filtrado y secado desde medios de cultivo líquidos o sólidos (Sutton y Starzyk, 1973; Taniwaki y cols. 2005; Metreveli, 2017), ensayos químicos para evaluar la presencia de moléculas que son producidas por los hongos como el ergosterol (Ng y cols., 2008) y la medición del crecimiento radial en medios de cultivo sólido en placa (Miyashira y cols., 2010; Tay y cols., 2011).

En relación a la cinética de crecimiento del micelio, se ha planteado que debe hacerse la diferencia entre la tasa de crecimiento específica y la tasa de crecimiento de extensión (Moore y cols., 2011). En el primer caso, se mide el incremento de la biomasa en el tiempo, el cual tiene un carácter exponencial y suele obtenerse a partir del peso seco del micelio, mientras que, en el segundo, se mide la extensión de las hifas apicales o el crecimiento radial del micelio que coloniza un determinado sustrato en el tiempo, el cual tiene un carácter lineal (Baldrian y Gabriel, 2002; Rojas y Hormaza, 2015) y se ha reportado que también puede ser sigmoideo (García y cols., 2013). En esta línea, la

regresión de Gompertz con la modificación de Zwietering ha sido utilizada previamente para modelar el crecimiento radial de hongos filamentosos (Char y cols., 2007; Altieri y cols., 2007) y el crecimiento numérico de bacterias (Tjørve y Tjørve, 2017). A su vez, el modelo permite obtener tasas de crecimiento a partir de la tangente a la zona de crecimiento de la curva sigmoidea. Para el caso de esta investigación, se aplicó esta regresión sobre los valores de diámetro de colonia en el tiempo para las cepas *P. ostreatus*, KRK27, KRK78, KRK252 y KRK283 (Figura 5). Los coeficientes de determinación R^2 de la regresión, fueron iguales o superiores a 0,98 para el caso de los primeros 4 hongos, lo que indica que el modelo se ajustó de buena forma a los datos de incremento radial registrados. Por su parte, la cepa KRK283 presentó un valor R^2 de 0,53, por lo que el modelo no logró ajustarse a los datos de crecimiento radial de este hongo y, por lo tanto, los respectivos parámetros cinéticos no describen la dinámica de crecimiento del mismo. El hecho de que el modelo no se ajustó a la curva de crecimiento de esta cepa, puede tener relación con que el cálculo de los valores de diámetro de colonia se realizó a partir de las mediciones de superficie de colonización en las respectivas placas asumiendo un área circular. Al observar la morfología de la colonia de KRK283 en la Figura 9, se logra apreciar que esta posee un carácter irregular y que dista de ser circular. Por lo tanto, lo anterior sugiere que la metodología utilizada en la presente investigación es aplicable sólo a hongos que generen colonias regulares y circulares. La ventaja de medir la superficie de la colonia y después transformar esta información en diámetro o radio asumiendo colonias circulares, es que es posible tener un valor representativo del incremento del radio en todas las direcciones posibles. Sin embargo, existe otra variante a considerar para futuras investigaciones que impliquen la medición de crecimiento radial de hongos, la cual consiste en realizar mediciones en 3 o más direcciones del incremento del radio de la colonia en una placa y posteriormente

realizar un promedio de estas (Jones y cols., 2018b). Además, para aumentar la cantidad de datos tomados por cultivo, el inóculo suele incorporarse en uno de los bordes del medio sólido, con lo cual el micelio debe atravesar toda la placa para colonizarla completamente. Este método podría aplicarse para aquellas cepas que no presentan colonias regulares y circulares, y los valores medidos de incremento radial en las distintas direcciones podrían someterse a un test ANOVA para evaluar si las diferencias de medición son significativas o no.

De acuerdo a los valores de las tasas de crecimiento radial, las cepas KRK78 y KRK27 poseen valores que son 2,3 y 2,1 veces superiores a la tasa de *P. ostreatus* respectivamente. Este resultado es notable ya que las cepas KRK27 y KRK78 son cepas silvestres y *P. ostreatus* es una especie utilizada de forma comercial. En este sentido, las cepas de este último hongo que se utilizan en la industria alimenticia han sido sometidas a una selección en base a sus altas tasas de crecimiento a lo largo de los años (Curvetto y cols., 2002; Ahmed y cols., 2013). A pesar de esto, existe un estudio previo en el que se ha comparado las tasas de crecimiento radial de *T. versicolor* y *P. ostreatus*, presentando el primero una tasa de crecimiento radial superior a *P. ostreatus* (Rojas y Hormaza, 2015). Sin embargo, también se observó que las tasas de crecimiento para ambos hongos fueron iguales en medio AST (Agar Salvado de Trigo), el que se caracteriza por ser rico en celulosa a diferencia del PDA (Cui y cols., 2013). De esta forma, la celulosa puede estar induciendo en *P. ostreatus* un metabolismo que le permite crecer a una tasa idéntica a la de *T. versicolor* en este medio. En otro estudio, se ha observado que la tasa de crecimiento radial de *P. ostreatus* es mayor en medios de cultivo sólido con salvado de trigo y caña de azúcar respecto al medio PDA-celulosa (Joshi y cols., 2020). Por lo tanto, aunque según los resultados las cepas KRK27 y KRK78 poseen tasas de crecimiento radial mayores a *P. ostreatus* en medio PDA, el

micelio de cada cepa puede presentar otra dinámica de crecimiento dependiendo de la complejidad del medio. En esta línea, medios de cultivo como el PDA o el MEA (Malt-Extract Agar) no poseen un contenido nutricional que se asemeje al de los sustratos que se utilizan para la producción de materiales compuestos de micelio, los que suelen ser desechos agroindustriales ricos en celulosa y lignina (Sundarraaj y Ranganathan, 2018). Considerando esto, la elección de cepas en base a su crecimiento radial en medios como el PDA o el MEA no es la más adecuada si se busca utilizar el hongo con el fin de elaborar materiales de micelio, en contraste a lo planteado en otros estudios que así lo proponen (Jones y cols., 2018 b). De esta forma, si bien la metodología utilizada permite sistematizar la prueba de crecimiento en placa, mediante la selección de cepas con una mayor tasa de crecimiento radial, en próximos estudios el esquema experimental debe plantearse en medios de cultivo que tengan un alto contenido de celulosa, lignina y/o cualquier otro nutriente que se encuentre presente en los sustratos de interés para materiales de micelio. Entre los medios que se pueden incorporar para este tipo de pruebas se encuentran el medio AST (Varghese y cols., 2017), agar celulosa (Santra y Sen, 2019; Abdollahi y cols., 2019), agar extracto de paja (Rajendran y cols., 1991), agar con medio de sal mínima y lignina alcalina (Sasikumar y cols., 2014) y medios con agar y sustratos lignocelulósicos en polvo como aserrín, salvado de trigo y caña de azúcar (Joshi y cols., 2020).

Por otra parte, para que los materiales de micelio logren competir con materiales tradicionales, estos deben tener propiedades materiales comparables a estos y su producción debe ser rápida (Jones y cols., 2018 b). Los principales factores que afectan la producción y las propiedades de este tipo de biomaterial, corresponden al tipo de hongo que se utiliza, el sustrato que se selecciona para su cultivo, la interacción que tiene el hongo con el sustrato y las variables de manufacturación tales como periodos

de incubación, método de secado, entre otros (Elsacker y cols., 2019). En esta línea, la tasa de crecimiento radial de un hongo puede entregar información respecto a la rapidez de producción de un material de micelio, sin embargo, no se han realizado estudios en los que se utilice este parámetro como predictor de las propiedades del biomaterial. No obstante, se ha reportado que algunas propiedades físico-mecánicas de los materiales de micelio, tales como la elasticidad y la resistencia máxima a la tracción, dependen significativamente de la densidad del material (Islam y cols., 2017). Estas dos propiedades, junto a la resistencia a la compresión y la flexibilidad, son de gran interés al momento de caracterizar materiales de micelio que se han propuesto para su utilización en construcción, tales como espumas aislantes y ladrillos (Girometta y cols, 2019).

En relación a la densidad del micelio en un biomaterial, uno de los factores que más influyen en su incremento, son las ramificaciones que ocurren en las hifas (Harris, 2019). Estas ramificaciones, pueden darse en la zona apical de las hifas que se encuentran en elongación en el borde de la colonia, caso en el que se denominan ramificaciones apicales, o en zonas subapicales, caso en el que se denominan ramificaciones laterales (Harris, 2008). Estas últimas varían en el tiempo y espacio de colonización (Moore y cols., 2011; Harris, 2019), presentándose mayormente en zonas envejecidas del micelio, las que en medios de cultivo en placa corresponden al lugar donde se realiza la inoculación. Además, se ha reportado que la tasa de extensión de las hifas en crecimiento se ve afectada por las ramificaciones apicales, pero no por las ramificaciones laterales (Harris, 2008). En relación a esto, se ha encontrado que mutantes del hongo filamentoso *Neurospora crassa* a los que se les ha hecho un *knockout* en el gen que expresa la proteína quitina sintasa CHS-6, presentan una hiper ramificación apical, un micelio más compacto y una tasa de crecimiento radial

disminuida respecto a otras cepas mutantes en las que se ha alterado la expresión de otras quitinas sintasas (Fajardo-Somera y cols., 2015). En esta misma línea, en un estudio reciente se obtuvo que la tasa de crecimiento radial de *T. versicolor* es mayor a la de *P. ostreatus* en MEA (Malt-Extract Agar), sin embargo, también se detectó que esta última especie posee un mayor incremento de densidad respecto a la primera (Jones y cols., 2018 b). De este modo, un hongo con una alta tasa de crecimiento radial puede presentar una menor densidad respecto a un hongo que tiene una menor tasa de crecimiento radial. Estos antecedentes plantean una relación inversa entre la densidad, que depende de las ramificaciones de las hifas, y la tasa de crecimiento radial para la colonización de un determinado sustrato con micelio. Esta premisa, es de interés para próximos estudios, en los que se podría medir la tasa de crecimiento radial y específica de las cepas KRK27 y KRK78 en relación a *P. ostreatus* en un medio de cultivo lignocelulósico en placa, para evaluar si la relación inversa se cumple para estos hongos. Además, tomando en cuenta que el objetivo de realizar pruebas de crecimiento en placa es seleccionar especies fúngicas para producir ladrillos de micelio en una escala industrial, se podrían realizar experimentos que contemplen la producción de una gran cantidad de ladrillos de micelio con los hongos de interés y evaluar si los periodos de colonización, las propiedades físico-mecánicas, la densidad y la ramificación del micelio tienen una correlación con las tasas de crecimiento. Con los resultados de estos experimentos se podría evaluar si estos parámetros cinéticos permiten predecir las características del biomaterial final.

Otra cualidad del micelio que debe ser considerada en próximos estudios, es el tipo de hifas que presenta el hongo. El micelio se ha clasificado bajo el sistema mítico, el cual define si un determinado hongo posee hifas generativas (ramificación moderada y pared celular delgada), de unión (altamente ramificadas y pared celular gruesa),

esqueléticas (sin ramificaciones y pared celular gruesa) o una combinación de estas (Webster y Weber, 2015; Graf y cols., 2018; Jones y cols., 2020a). Existe un solo estudio que ha planteado utilizar este tipo de clasificación como predictor de dinámicas de crecimiento de hongos con el potencial de ser utilizados para producir materiales basados en micelio (Jones y cols, 2018b), descartándose dicha funcionalidad para esta clasificación. Por lo tanto, es esperable que, en adición al estudio de las cinéticas de crecimiento de un hongo de interés, se lleven a cabo una mayor cantidad de investigaciones que ahonden en la relación entre las características del micelio cuando el hongo coloniza sustratos lignocelulósicos y las propiedades de los materiales resultantes. Respecto a las características químicas de las hifas, se ha encontrado que las especies *Ganoderma lucidum* y *P. ostreatus*, presentan una mayor concentración de quitina en la pared celular de las hifas cuando estas crecen en sustratos con celulosa como única fuente de carbono, a diferencia de cuando crecen en sustratos con celulosa en adición a nutrientes de fácil absorción como los presentes en PDB (Haneef y cols., 2017). La quitina es un polisacárido que le brinda rigidez a la pared celular de los organismos fúngicos, por lo que tiene una gran influencia en las propiedades físico-mecánicas del micelio. De esta manera, la composición química de la pared celular de las hifas que han colonizado un determinado sustrato es otro factor a considerar en futuras investigaciones. Este aspecto en particular presenta un potencial biotecnológico en cuanto a la modificación genética de hongos filamentosos para incrementar la síntesis de elementos de la pared celular como la quitina, mediante la sobreexpresión de quitinas sintasas. De esta forma, se podrían obtener hongos con propiedades de interés en el contexto de la biofabricación. En este sentido, técnicas de ingeniería genética ya se han utilizado en *P. ostreatus* para modificar, por ejemplo, la composición

de secretomas enzimáticos para inducir una degradación preferente de lignina sobre celulosa (Yoav, 2018).

Respecto a otros parámetros cinéticos de la regresión de Gompertz obtenidos a partir de las curvas de los hongos trabajados en esta investigación, se tiene que los valores del tiempo lag l para las distintas especies abarcan un rango de valores que va desde los $0,58 \pm 0,303$ días a los $1,34 \pm 0,240$ días ($13,9 \pm 0,01$ y $32,1 \pm 0,01$ horas respectivamente). Sin embargo, el primer registro realizado después del tiempo 0, fue al tercer día, por lo que se estima que los datos no permiten describir con certeza esta zona de la curva de crecimiento. De esta forma, para próximos experimentos deben tomarse mediciones en periodos de horas durante el primer día de crecimiento y una mayor cantidad de mediciones en los días siguientes para tener más certeza respecto al valor de este parámetro.

En cuanto a los valores de A , estos no representan el diámetro total de crecimiento de los hongos, ya que se restó el valor del diámetro a tiempo 0 a los valores de diámetro de cada medición, el cual corresponde al diámetro del inóculo que fue distinto para cada hongo. El valor de A como tal, puede no ser de gran utilidad en el caso de las cepas que colonizan la placa en su totalidad ya que este parámetro estará determinado por el máximo diámetro que se puede colonizar por las dimensiones de la placa. A pesar de esto, cuando se trabaja con cepas que no colonizan la totalidad de la placa como lo es el caso de las cepas KRK252 y KRK283 (Figura 9), este parámetro puede brindar información relevante respecto a los requerimientos nutricionales de un hongo al ser cultivado en un determinado medio de cultivo. Tomando en cuenta que las placas se incubaron selladas con Parafilm, es posible que KRK283 tenga requerimientos de oxígeno mayores a las otras cepas, agotando en etapas tempranas de crecimiento este recurso y/o siendo necesaria una mayor concentración de este nutriente. Otro factor

a considerar es que las distintas cepas se sacaron de la incubadora al momento de realizar los registros, perdiendo la condición de oscuridad. Los hongos pueden presentar distintas respuestas frente a la exposición a la luz (Beever y Bollard, 1970), por lo que puede que KRK283 se haya visto afectado por la luz ambiental al momento de generar los registros, cambiando su dinámica de crecimiento a un estado de menor crecimiento o latencia (Yusef y Allam, 1966).

2. Prueba de crecimiento en *spawn*

En cuanto al crecimiento en *spawn*, las metodologías utilizadas en estudios previos para evaluar el crecimiento de hongos en este formato se basan principalmente en la medición del tiempo que demoran en colonizar la totalidad de los granos, lo cual se determina mediante la observación directa de la superficie del sustrato que está en contacto con la bolsa (Iqbal y cols., 2016; Kerketta y cols., 2020). Esto implica que no se tiene un control de lo que ocurre en el interior del *spawn* en términos de visibilidad de contaminantes y colonización del micelio. La incidencia de contaminantes es un problema recurrente en el proceso productivo de *spawn* (Oei, 2005) y se puede dar por diversos motivos, como un inóculo impuro, una esterilización incompleta del grano, falencias en las condiciones de esterilidad que se manejan al momento de inocular o rupturas en el recipiente (Paswan y Verma, 2014). Es por esto que de forma adicional al aumento de las condiciones de esterilidad en las que se trabaja en las distintas etapas del proceso y la esterilización misma del grano, se han propuesto diversos métodos para controlar los contaminantes que aparecen en el *spawn*, como la aplicación de radiación (Moreaux, 2017), químicos (Sharma y Kumar, 2007), fungicidas y fitoextractos (Shamoli y cols., 2016; Chang y Miles, 2004). Para el caso de la prueba de crecimiento en *spawn* de este trabajo, se presentaron contaminaciones en los *spawn* que fueron agitados y en

los que no, para las 3 especies utilizadas. Además, los dos controles también presentaron contaminantes. Tomando en cuenta que los controles no se inocularon con los hongos, los resultados sugieren que los contaminantes encontrados tienen un origen en etapas previas a este proceso, como en la esterilización del grano. Respecto a este punto, existen recomendaciones en la literatura donde se sugiere lavar el grano antes de esterilizarlo con el objetivo de bajar la carga de contaminantes ambientales (Stamets, 1993), lo cual no se realizó para este experimento y que podría incluirse a futuro, considerando que el trigo candeal tiene un origen agroindustrial y por lo tanto ha estado expuesto a grandes cargas ambientales fúngicas. Además de esta recomendación, también se suele proponer un tiempo de autoclavado del sustrato de 40 minutos (Moreaux, 2017), lo cual, a diferencia del caso anterior, sí se consideró en esta investigación. Sin embargo, en la literatura también se pueden encontrar rangos que van desde los 90 minutos a 4 horas (Stamets, 1993; McCoy, 2016), por lo que las contaminaciones obtenidas probablemente se deben a que el tiempo de esterilización utilizado fue insuficiente.

Por otro lado, las tasas de contaminación calculadas de forma posterior a la agitación del día 12 (Tabla 2) de los *spawn* agitados y no agitados de *P. ostreatus*, fueron de 33% para ambos casos. Los *spawn* de las cepas KRK27 y KRK78 que fueron agitados, presentaron una tasa de contaminación de 67% para ambos casos mientras que de los *spawn* que no fueron agitados, solo KRK78 presentó contaminaciones, con una tasa de 33%. De esta forma, los *spawn* de las cepas silvestres presentaron una mayor incidencia de contaminantes en la condición de agitación respecto a la condición sin agitación. Para el caso de los *spawn* que son agitados, si bien existe la posibilidad de que este tipo de tratamiento haya generado roturas en la bolsa y esto haya favorecido las contaminaciones, el hecho de que los *spawn* que no se sometieron al tratamiento de

agitación de igual forma presentaron contaminantes para todas las cepas, sugiere que estos se encontraban desde antes. A pesar de esto, el hecho de que los hongos silvestres presentaran una tasa de contaminación mayor que *P. ostreatus* en el tratamiento de agitación sugiere que la respuesta de los primeros frente a la aparición de contaminantes, es menos eficaz que la de este último hongo al someterse a este tratamiento. Además, al observar las imágenes de la figura 11, se tiene que después de la agitación del día 12 en los *spawn* de KRK27 y KRK78 sometidos a los tratamientos con y sin agitación, se evidenció una menor cantidad de micelio visible en relación a los *spawn* de *P. ostreatus*. En este contexto, se ha reportado que la colonización del sustrato presenta una ventaja para el hongo ya que se evita la proliferación de contaminantes por exclusión competitiva (Cox y Scherm, 2006; Pani, 2011). De esta forma, es posible que la mayor incidencia de contaminantes observada en las cepas silvestres que se agitaron durante el periodo de investigación se deba a que los granos quedaron más expuestos a contaminantes después de cada agitación respecto a los *spawn* que no se agitaron. Para el caso particular de *T. versicolor*, se ha reportado que, al realizar más de una agitación durante los periodos de incubación en paja de trigo, el hongo presenta una menor bioconversión de nutrientes, impidiendo un contacto íntimo entre el micelio y el sustrato y a su vez, dificultando la colonización respecto a los cultivos agitados sólo una vez (Yadav y Tripathi, 1991).

La poca abundancia de micelio en los *spawn* de las cepas silvestres tras la agitación en relación a *P. ostreatus*, puede deberse a que su densidad es menor respecto a este último hongo al crecer en trigo. Al respecto, se ha reportado que si bien en medio de cultivo sólido PDA la tasa de crecimiento radial de *T. versicolor* es mayor a la de *P. ostreatus* en MEA, esta última especie posee un mayor incremento de densidad respecto a la primera (Jones y cols., 2018 b). Por otro lado, en medio de cultivo AST, el

cual posee nutrientes similares al grano de trigo debido a que incluye el salvado del mismo, se ha encontrado que la tasa de crecimiento radial es idéntica para ambos hongos (Cui y cols., 2013), sin embargo, no se ha medido la biomasa o la densidad de estos en este medio de cultivo. De esta forma, estos antecedentes suscitan gran interés de investigación respecto a la medición de la densidad del micelio para las cepas KRK27, KRK78 y *P. ostreatus* en trigo, con la finalidad de comprobar si la abundancia de micelio en el *spawn* de estos hongos tiene relación con la densidad.

Por otro lado, es posible que las cepas KRK27 y KRK78 se encuentren envejecidas debido a que se ha estado reproduciendo el tejido de estas por un periodo de dos años para diversos experimentos del laboratorio. En este sentido, algunos autores han establecido la diferencia entre el *spawn* madre, que corresponde a la primera generación de *spawn* obtenida a partir del micelio aislado en placa desde un cuerpo fructífero, y las generaciones siguientes obtenidas a partir de ésta (Stamets, 1993). Esta diferencia tiene relación con el hecho de que el micelio se va degenerando a medida que se va reproduciendo en medios de cultivos o *spawn* (Moreaux, 2017). En este contexto, se recomienda conservar lo más posible el *spawn* madre para obtener múltiples subcultivos a partir de este mismo (Stamets, 1993). La degeneración del micelio tiene como consecuencia que este tenga una colonización lenta, una alta fragilidad, una tasa baja de sobrevivencia y bajos niveles de producción de cuerpos fructíferos (Chang y Miles, 2004; Chen y cols., 2019). De esta forma, es posible que la poca abundancia de micelio tras la agitación tenga relación con que el micelio se encuentra degenerado y, por lo tanto, es más frágil. Esta fragilidad puede estar afectando la adherencia que tiene el micelio a los granos de trigo, por lo que, frente a un estrés mecánico, el tejido puede estar desprendiéndose del sustrato. En este contexto, se debe comprobar el estado en que se encuentran las cepas del laboratorio,

las cuales se han preservado a 4°C en un refrigerador corriente y se han ido replaqueando en el tiempo. Al respecto, existen protocolos de preservación a 4°C en glicerol, que pueden ser incorporados en el laboratorio (Paul y cols., 2015). Los síntomas visibles de la degeneración del micelio son observables de forma directa en los cuerpos fructíferos y primordios del hongo, sin embargo, algunos estudios han propuesto reacciones colorimétricas para detectar micelio degenerado (Magae y cols., 2005). De comprobarse la degeneración del tejido, es de gran interés realizar una nueva prueba de crecimiento en granos de trigo utilizando micelio degenerado y no degenerado, para evaluar si la abundancia de micelio es distinta entre estos linajes al someterlos al estrés mecánico de agitación. Debido a que estas cepas tienen un origen silvestre, volver a tomar muestras del organismo original es una alternativa inviable. De esta forma, una manera de obtener un tejido renovado es mediante la inducción del ciclo reproductivo sexual del hongo para la obtención de esporas a partir de cuerpos fructíferos, las que al ser cultivadas generan un organismo nuevo (Moreaux, 2017). Por otro lado, las técnicas de co-cultivo se utilizan ampliamente para estudiar relaciones entre hongos de pudrición blanca y contaminantes o competidores habituales (Albert y cols., 2011), por lo que en un próximo estudio se podría realizar un co-cultivo con micelio de las cepas silvestres degeneradas y no degeneradas enfrentadas a hongos que usualmente contaminan este tipo de cultivos. Este último experimento, se realizaría con la finalidad de explorar las dinámicas de respuesta a competidores por parte de los hongos de interés bajo una condición de degeneración.

El crecimiento de micelio sobre granos como el trigo, entra en la categoría de fermentación en estado sólido (FES) (Bechara y cols., 2011; Curvetto y Postemsky, 2015) y la medición de la biomasa en este tipo de fermentación es particularmente complicada debido a la adherencia entre el tejido fúngico y el sustrato. Por lo tanto, las

metodologías directas de medición de biomasa, como la medición del peso seco, y las indirectas, basadas principalmente en la medición de metabolitos secundarios y componentes celulares que están exclusivamente en hongos (Manan y Webb, 2018), implican la pérdida del sustrato debido a que es sometido al respectivo procedimiento analítico. De esta forma, estas metodologías son imprácticas en términos productivos para hacer seguimiento del crecimiento fúngico en FES. Es por esto, que la forma de evaluar un *spawn* es mediante la observación directa de este cuando coloniza la completitud de los granos. Una posibilidad de gran interés para evaluar la colonización de los granos utilizados en el *spawn* o cualquier otro sustrato es mediante la medición de la absorción acústica, propiedad que se ha reportado en materiales colonizados con micelio con un máximo de absorción en una frecuencia de 1000 Hz (Pelletier y cols., 2013; Appels y cols., 2019). Si es posible encontrar una relación entre la capacidad de absorción de estos sustratos a esta frecuencia y el porcentaje de colonización del hongo, se podría monitorear el crecimiento de micelio de una forma no invasiva.

En un contexto más amplio que el de la biofabricación, se ha planteado que un fracaso al momento de lograr un cultivo de hongos satisfactorio puede estar relacionado a un *spawn* de baja calidad (Chang, 2009), lo cual implica que el sustrato se encuentra poco colonizado o bien colonizado superficialmente. Es por esto que un correcto procedimiento de preparación de *spawn* y una posterior evaluación efectiva del micelio para una determinada cepa, deben tenerse en cuenta al momento de realizar un proceso de producción de ladrillos. En este sentido, el esquema experimental utilizado en esta investigación ha permitido sistematizar la evaluación del crecimiento de los *spawn* de las cepas silvestres KRK78 y KRK27 en comparación al hongo comercial *P. ostreatus*. Sin embargo, las tasas de contaminación evidencian que el protocolo de producción de *spawn* debe ser mejorado para realizar pruebas en las que se estudien condiciones

como el estrés mecánico. De esta forma, en próximos experimentos que utilicen este marco experimental, es esperable que se considere un aumento en los tiempos de esterilización y un lavado del sustrato a utilizar, que en esta investigación fue trigo, antes de su cocción. Además, debe considerarse trabajar con tejidos fúngicos renovados para descartar que la degeneración del micelio pueda estar influyendo en los fenómenos observados en el experimento.

CONCLUSIONES

- La metodología de medición de tasas de crecimiento radial utilizada en la presente investigación ha permitido sistematizar la prueba de crecimiento en placa, sin embargo, los resultados sugieren que esta es aplicable sólo a hongos que generen colonias regulares y circulares al crecer en medios de cultivo sólido en placa. Como alternativa a las colonias que no son regulares ni circulares, se pueden realizar mediciones en múltiples direcciones del incremento del radio de la colonia en los cultivos, para luego obtener un promedio de estos valores.
- La elección de cepas en base a su crecimiento radial en medios como el PDA no es la más adecuada si se busca utilizar el hongo con el fin de elaborar materiales de micelio. En próximos estudios se debe aplicar la metodología de esta investigación en medios lignocelulósicos.
- El esquema experimental utilizado en esta investigación ha permitido sistematizar la evaluación del crecimiento en *spawn* de las cepas silvestres KRK78 y KRK27 en comparación al hongo comercial *P. ostreatus*. Sin embargo, las tasas de contaminación evidencian que el protocolo de producción de *spawn* debe ser mejorado para realizar pruebas en las que se estudien condiciones como el estrés mecánico.
- Los resultados sugieren que la mayor incidencia de contaminantes en los *spawn* de KRK27 y KRK78 que fueron agitados durante el periodo de incubación respecto a los no agitados, puede tener relación con que los granos de trigo quedaron más expuestos a contaminantes debido a la poca abundancia de micelio tras cada agitación.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdollahi, M., Damirchi, S., Shafafi, M., Rezaei, M., Y Ariaai, P. 2019. Carboxymethyl cellulose-agar biocomposite film activated with summer savory essential oil as an antimicrobial agent. *International journal of biological macromolecules*, **1**(126): 561–568
- Ahmed, M., Abdullah, N., Ahmed, K. U., Y Bhuyan, M. H. M. B. 2013. Yield and nutritional composition of oyster mushroom strains newly introduced in Bangladesh. *Pesq. Agropec. Bras., Brasília*, **48**(2): 197–202.
- Albert, S., Chauhan, D., Pandya, B., Y Padhiar, A. 2011. Screening of *Trichoderma spp.* as potential fungal partner in co-culturing with white rot fungi for efficient bio-pulping. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, **6**(3): 95–101.
- Altieri, C., Cardillo, D., Bevilacqua, A., Y Sinigaglia, M. 2007. Inhibition of *Aspergillus spp.* and *Penicillium spp.* by fatty acids and their monoglycerides. *Journal of Food Protection*, **70**(5): 1206–1212.
- Appels, F. V. W., Camere, S., Montalti, M., Karana, E., Jansen, K. M. B., Dijksterhuis, J., Krijgsheld, P., Y Wösten, H. A. B. 2019. Fabrication factors influencing mechanical, moisture and water-related properties of mycelium-based composites. *Materials and design*, **161**: 64–71.
- Attias, N., Danai, O., Abitbol, T., Tarazi, E., Ezov, N., Pereman, I., Y Grobman, Y. J. 2020. Mycelium bio-composites in industrial design and architecture: comparative review and experimental analysis. *Journal of cleaner production*, **246**: 119037.
- Attias, N., Danai, O., Ezov, N., Tarazi, E., Y Grobman, Y. J. 2017. Developing novel applications of mycelium based bio- composite materials for design and architecture. En Attias, N., Danai, O., Ezov, N., Tarazi, E., Y Grobman, Y. J. (Eds). Pp 1-10. *Building with bio-based materials: best practice and performance specification*. Technion Israel Institute of Technology, Haifa, Israel.
- Baldrian, P., Y Gabriel, J. 2002. Intraspecific variability in growth response to cadmium of the wood-rotting fungus *Piptoporus betulinus*. *Mycologia*, **94**(3): 428 - 436.
- Bechara, M. A., Heinemann, P. H., Walker, P. N., Y Romaine, C. P. 2011. A two-phase solid-state fermentation process for mushroom (*Agaricus bisporus*) production on cereal grains. *Biological Engineering*, **4**(4): 219–229.
- Beever, R. E., Y Bollard, E. G. 1970. The nature of the stimulation of fungal growth by potato extract. *Journal of General Microbiology*, **60**(2): 273–279.

- Benjamin D. 2017. Living matters. En Tibbits, S. (ed), Active Matter. Pp 255-260. Massachusetts Institute of Technology, Boston, United States.
- Blackwell, M. 2011. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species?. American journal of botany, **98**(3): 426–438.
- Calam, C. T. 1969. The evaluation of mycelial growth. Methods in microbiology. **1**: 567–591.
- Carlile, M. J., Watkinson, S., Y Gooday, G. W. 2001. Fungal diversity. En Carlile, M. J., Watkinson, S., Y Gooday, G. W (eds), The Fungi (2da ed.). Pp 17-19. Academic press, San Diego, California.
- Cerimi, K., Akkaya, K. C., Pohl, C., Schmidt, B., Y Neubauer, P. 2019. Fungi as source for new bio-based materials: a patent review. Fungal biology and biotechnology, **6**(1): 1–10.
- Chan, C. K., Y Yao, X. 2008. Air pollution in mega cities in china. Atmospheric Environment, **42**: 1–42.
- Chang, S., Y Miles, P. G. 2004. Mushrooms - Cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact (2da ed.). Pp 176. Crc press, Florida.
- Chang S.T. 2009. Overview of mushroom cultivation and utilization as functional foods. En P. C. K. Cheung (Ed.), Mushrooms as functional foods. Pp 13-15. John Wiley & sons, New Jersey.
- Char, C. D., Guerrero, S. N., Y Alzamora, S. M. 2007. Growth of *Eurotium chevalieri* in milk jam: influence of ph, potassium sorbate and water activity. Journal of food safety, **27**(1): 1–16.
- Chauvette, A., Schick-Makaroff, K., Y Molzahn, A. E. 2019. Open data in qualitative research. International journal of qualitative methods. **18**: 1–6.
- Chen, X., Zhang, Z., Liu, X., Cui, B., Miao, W., Y Cheng, W. 2019. Characteristics analysis reveals the progress of *Volvariella volvacea* mycelium subculture degeneration. **1**: 1–10.
- Corporación chilena de artes y electrónica. 2019. 14 bienal de artes mediales de Santiago. Extraído de: <https://www.bienaldeartesmediales.cl/14/>
- Cox, K. D., Y Scherm, H. 2006. Interaction dynamics between saprobic lignicolous fungi and *Armillaria* in controlled environments: exploring the potential for competitive exclusion of *Armillaria* on peach. Biological control. **37**(3): 291–300.
- Cui, S. W., Wu, Y., Y Ding, H. 2013. The range of dietary fibre ingredients and a comparison of their technical functionality en J. Delcour Y K. Poutanen (Eds.),

Fibre-rich and wholegrain foods: improving quality. Pp. 96–119. Cambridge press, United Kingdom.

Curvetto, N. R., Figlas, D., Devalis, R., Y Delmastro, S. 2002. Growth and productivity of different *Pleurotus ostreatus* strains on sunflower seed hulls supplemented with N – NH₄⁺ and / or MN (II). *Bioresource Technology*, **84**: 171–176.

Curvetto, R., Y Postemsky, P. D. 2015. International biodeterioration y biodegradación solid-state fermentation of cereal grains and sunflower seed hulls by *Grifola gargar* and *Grifola sordulenta*. *International biodeterioration & biodegradación*, **100**: 52–61.

Deeg, K., Gima, Z., Smith, A., Stoica, O., Y Tran, K. 2017. Greener solutions: improving performance of mycelium-based leather (Reporte N°290, Greener Solutions).

Elsacker E. E., Vandelook, S., Brancart, J., Peeters, E., Y Laet, L. D. 2019. Mechanical, physical and chemical characterisation of mycelium-based composites with different types of lignocellulosic substrates. *PLoS ONE*, **14**(7): e0213954.

Fajardo-Somera, R. A., Jöhnk, B., Bayram, Ö., Valerius, O., Braus, G. H., Y Riquelme, M. 2015. Dissecting the function of the different chitin synthases in vegetative growth and sexual development in *Neurospora crassa*. *Fungal genetics and biology*, **75**: 30–45.

Fuentes, A., Y Rodriguez, S. 2019. Introducción. En Fuentes A. Y Rodriguez S. (eds.), *Manual de biofabricación con hongos*. Pp 9. Laboratorio de Biofabricación FADEU-PUC, Santiago, Chile.

García-Peñalvo, F. J. 2017. Publishing in open access. *Journal of Information Technology Research*, **10**(3): vi-viii.

Garcia, D., Ramos, A. J., Sanchis, V., Y Marín, S. 2013. International journal of food microbiology modeling kinetics of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in maize-based medium and maize grain. *International Journal of Food Microbiology*, **162**(2): 182–189.

Ghazvinian, A., Farrokhsiar, P., Y Gursoy, B. 2019. Mycelium-based biocomposites for architecture: assessing the effects of cultivation factors on compressive strength. *Material Studies and Innovation*, **2**: 505-514.

Girometta, C., Picco, A. M., Baiguera, R. M., Dondi, D., Babbini, S., Cartabia, M., Pellegrini, M., Y Savino, E. 2019. Physico-mechanical and thermodynamic properties of mycelium-based biocomposites: a review. *Sustainability*, **11** (281).

- Glass, N. L., Rasmussen, C., Roca, M. G., Y Read, N. D. 2004. Hyphal homing, fusion and mycelial interconnectedness. *Trends in Microbiology*, **12**(3): 135–141.
- González-Solar, L., Y Fernández-Marcial, V. 2019. Sci-hub, a challenge for academic and research libraries. *El profesional de la información*, **28**(1): 1–12.
- Graf, L. V., Barbieri, F., Sperb, E., Soares Rivaldo, D., De A. Moura, L., Rosa, R. M., A. Reck, M., Y Nogueira-De-Sá, F. 2018. Factors affecting the structure of coleoptera assemblages on bracket fungi (basidiomycota) in a brazilian forest. *Biotropica*, **50**(2): 357–365.
- Han, I. 2012. The pollution caused by building materials and the strategy to control it. *Advanced Material Research*, **507**: 3–6.
- Haneef, M., Ceseracciu, L., Canale, C., Bayer, I. S., Heredia-Guerrero, J. A., Y Athanassiou, A. 2017. Advanced materials from fungal mycelium: fabrication and tuning of physical properties. *Scientific reports*, **7**: 1–11.
- Harris, S. D. 2008. Branching of fungal hyphae: regulation, mechanisms and comparison with other branching systems. *Mycologia*, **100**(6): 823–832.
- Harris, S. D. 2019. Hyphal branching in filamentous fungi. *Developmental Biology*, **451**(1): 35–39.
- Himmelstein, D. S., Romero, A. R., Munro, T. A., Mclaughlin, S. R., Tzovaras, B. G., Y Greene, C. S. 2018. Sci-hub provides access to nearly all scholarly literature authors. *Elife*. **7**: e32822
- Imtiajj, A., Y Rahman, S. A. 2008. Economic viability of mushrooms cultivation to poverty reduction in Bangladesh tropical and subtropical agroecosystems. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, **8**(1): 93–99.
- Iqbal, B., Saifullah, S., Khan, I., Y Shah, B. 2016. Substrates evaluation for the quality, production and growth of oyster substrates evaluation for the quality, production and growth of oyster mushroom (*Pleurotus florida* Cetto). *Journal of Entomology and Zoology Studies*, **71**(10): 6388–6389.
- Islam, M. R., Tudryn, G., Bucinell, R., Schadler, L., Y Picu, R. C. 2017. Morphology and mechanics of fungal mycelium. *Scientific reports*, **7**(1): 1–12.
- Jena, L. K., Y Behera, B. 2017. Environmental crisis and human well-being: a review. *International Journal of Development and Sustainability*, **6**(8): 561–574.
- Jones, M., Bhat, T., Kandare, E., Thomas, A., Joseph, P., Dekiwadia, C., Yuen, R., John, S., Ma, J., Y Wang, C. 2018. Thermal degradation and fire properties of

fungal mycelium and mycelium - biomass composite materials. *Scientific Reports, Nature*. **8**: 17583.

Jones, M., Huynh, T., Dekiwadia, C., Daver, F., Y John, S. 2017. Mycelium composites: a review of engineering characteristics and growth kinetics. *Journal of Bionanoscience*, **11**(4): 241–257.

Jones, M., Huynh, T., Y John, S. 2018. Inherent species characteristic influence and growth performance assessment for mycelium composite applications. *Advanced materials letters*, **9**(1): 71–80.

Jones, M., Mautner, A., Luenco, S., Bismarck, A., Y John, S. 2020. Engineered mycelium composite construction materials from fungal biorefineries: a critical review. *Materials and Design*, **187**: 108397.

Joshi, K., Meher, M. K., Y Poluri, K. M. 2020. Fabrication and characterization of bioblocks from agricultural waste using fungal mycelium for renewable and sustainable applications. *Acs. Applied Biomaterials*, **3**(4), 1884–1892.

Justia Patents. 2020. Patents assigned to ecovative design, llc. En patents.justia.com. Extraído de: <https://patents.justia.com/assignee/ecovative-design-llc>

Karana, E., Barati, B., Rognoli, V., Y Zeeuw Van Der Laan, A. 2015. Material driven design (mdd): a method to design for material experiences. *International Journal of Design*, **9**(2): 35–54.

Karana, E., Y Camere, S. 2018. When the material grows: a case study on designing with mycelium-based materials. *International Journal of Design*, **12**(2): 1-18.

Kavanagh, K. 2005. Fungal fermentation system and products. En K. Kavanagh (ed.), *Fungi: biology and applications*. Pp 101-106. John Wiley, Maynooth, Ireland.

Kerketta, V., Shukla, C. S., Singh, H. K., Y Kerketta, A. 2020. Effect of grain substrates on spawn development and their impact on yield and yield attributing characters of *Pleurotus spp.* *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, **8**(6): 722-725.

Lampert, A. 2019. Over-exploitation of natural resources is followed by inevitable declines in economic growth and discount rate. *Nature Communications*, **10**(1): 1–10.

Lappa, I. K., Kizis, D., Natskoulis, P. I., Y Panagou, E. Z. 2015. Comparative study of growth responses and screening of inter-specific OTA production kinetics by *A. carbonarius* isolated from grapes. *Front. Microbiol.*, **6**(502).

- Manan M. Y Webb, C. 2018. Estimation of growth in solid state fermentation: a review malaysian journal of microbiology. *Malaysian Journal of Microbiology*, **14**(1): 61–69.
- Magae, Y., Akahane, K., Nakamura, K., Y Tsunoda, S. 2005. Simple colorimetric method for detecting degenerate strains of the cultivated basidiomycete *Flammulina velutipes* (enokitake). *Applied and Environmental Microbiology*, **71**(10): 6388–6389.
- McCoy, P. 2016. Working with fungi. McCoy Peter (ed), *Radical mycology*. Pp 251; 274. Chthaeus press, Portland, Oregon.
- Metreveli, E., Kachlishvili, E., Singer, S. W., Y Elisashvili, V. 2017. Alteration of white-rot basidiomycetes cellulase and xylanase activities in the submerged co-cultivation and optimization of enzyme production by *Irpex lacteus* and *Schizophyllum commune*. *Bioresource Technology*, **241**: 652–660.
- Miyashira, C. H., Tanigushi, D. G., Gugliotta, A. M., Y Santos, D. Y. A. C. 2010. Comparison of radial growth rate of the mutualistic fungus of *Atta sexdens* rubropilosa forel in two culture media. *Brazilian Journal of Microbiology*, **41**(2): 506–511.
- Moore, D., Robson, G. D., Y Trinci, A. P. J. 2011. Hyphal cell biology and growth on solid substrates. En D. Moore, G. D. Robson, Y A. P. J. Trinci (eds.), 21st century guidebook to fungi fungi. Pp 86-100. University press. Cambridge, United Kingdom.
- Moreaux, K. 2017. Spawn production. En Zied, D. C., Y Pardo-Giménez, A. (eds), *edible and medicinal mushrooms*. Pp 89; 118. Willey Blackwell, West Sussex, United Kingdom.
- Nevalainen H., Te´O V. Y Penttilä M. 2004. Application of genetic engineering for strain improvement in filamentous fungi. En Arora, D. K. (ed), *Handbook of fungal biotechnology*, second edition, revised and expanded. Pp 199-149. Marcel Dekker, New York.
- Ng, H., Raj, S. S. A., Wong, S. H., Tey, D., Y Tan, H. 2008. Estimation of fungal growth using the ergosterol assay: a rapid tool in assessing the microbiological status of grains and feeds. *Letters in Applied Microbiology*, **46**: 113-118.
- Oei, P. 2005. Small-scale mushroom cultivation. *Agrodok-series*, **40**: 1–86.
- Ogden A. Y prowse K. 2004. How to make oyster mushroom grain spawn in a simple way. En Gush R. (ed), *mushroom growers handbook*. Pp 71-74. Heineart inc., Seoul, Korea.
- Packer, A. L. 2009. The scielo open access: a gold way from the south. *Canadian Journal of Higher Education*, **39**(3): 111–126.

- Padinjakkara, A., Thankappan, A., Souza, F. G., Y Thomas, S. 2018. Biopolymers and biomaterials. A. Padinjakkara, A. Thankappan, F. G. Souza, Y S. Thomas (eds.). Apple academic press inc. Pp 26. Toronto, New Jersey
- Padmavati Mahila Visvavidyalayam, S., Y Pradesh, A. 2018. A review on production of edible mushrooms and their applications. Online International Journal of Pharmacy and Biological Sciences, **8**(2): 265–283
- Pani, B. K. 2011. Effect of age and quantity of spawn on milky mushroom production. Society of Applied Sciences **2**(4): 769–771.
- Paswan, A. K., Y Verma, R. N. 2014. An innovative method of preparation of healthy grain spawn. En Paswan, A. K., Y Verma, R. N. (eds), Proceedings of the 8th international conference on mushroom biology and mushroom products (icmbmp8). Pp 330–336. Jharkhand, india.
- Paul, J. S., Tiwari, K. L., Y Jadhav, S. K. 2015. Long term preservation of commercial important fungi in glycerol at 4°C. International Journal of Biological Chemistry, **9**(2): 79–85.
- Pelletier, M. G., Holt, G. A., Wanjura, J. D., Bayer, E., Y McIntyre, G. 2013. An evaluation study of mycelium based acoustic absorbers grown on agricultural by-product substrates. Industrial Crops & Products, **51**: 480–485.
- Pop, R. M., Puia, I. C., Puia, A., Chedea, V. S., Leopold, N., Bocsan, I. C., Y Buzoianu, A. D. 2018. Characterization of *Trametes versicolor*: Medicinal mushroom with important health benefits. Not. Bot. Horti. Agrobi., **46**(2): 343–349.
- Powell, A. 2012. Democratizing production through open source knowledge: from open software to open hardware. Media, Culture & Society, **34**(6): 691–708.
- Quintero, J. C., Lú-Chau, T. A., Moreira, M. T., Feijoo, G., Y Lema, J. M. 2007. Bioremediation of HCH present in soil by the white-rot fungus *Bjerkandera adusta* in a slurry batch bioreactor. **60**: 319–326.
- Rajendran, C., Baby, A., Kumari, S., Y Verghese, T. 1991. An evaluation of straw-extract agar media for the growth and sporulation of *Madurella mycetomatis*. Mycopathologia, **1**: 9–12.
- Raudaskoski, M. 2015. Mating-type genes and hyphal fusions in filamentous basidiomycetes. Fungal Biology Reviews, **29**(3–4): 179–193.
- Rodriguez, S. 2017. Material biobasado, compuesto del micelio del hongo *Trametes versicolor* y cáscaras de nuez. (Tesis de pregrado). Universidad de Chile. Santiago, Chile.

- Rojas Barreto, J. A., Y Hormaza Anaguano, A. 2015. Evaluación del crecimiento y compatibilidad de hongos de la podredumbre blanca. *Ciencia en Desarrollo*, **5**(2): 197–205.
- San antonio, J. P. 1971. A laboratory method to obtain fruit from cased grain spawn of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Mycologia*, **63**(1), 16–21.
- Sánchez, C. 2010. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **85**: 1321–1337.
- Santra, D., Y Sen, K. 2019. Generating cellulose-agar composite hydrogels for uptake-release kinetic studies of selenate and selenomethionine. *International Journal of Biological Macromolecules*. **122**: 395–404.
- Sasikumar, V., Priya, V., Shankar, C. S., Y Sekar, D. S. 2014. Isolation and preliminary screening of lignin degrading microbes. *Journal of Academia and Industrial Research*, **3**(6): 2012–2015.
- Shahrivar, S., Elahi, S., Hassanzadeh, A., Y Montazer, G. 2018. A business model for commercial open source software: a systematic literature review. *Information and Software Technology*. **103**: 202–214.
- Shamoli, F. A., Khair, A., Bhadra, M., Hossain, M. A., Sikder, M. M., Green, P., Pers, T., Y Oudem, T. 2016. Symptomatology of fungal competitors on oyster mushrooms spawn packets and in vitro evaluation using phytoextracts and a fungicide. *Int. J. Agril. Res. Innov. & Tech*, **6**(2): 24–30.
- Sharma, S. R., Y Kumar, S. 2007. Fungal diseases and competitor moulds. En S. R. Sharma Y S. Kumar (eds.), *Diseases and competitor moulds of mushrooms and their management*. Pp 5-7. Indian Council of Agricultural Research, Chambaghat, India.
- Sharma, S. R., Y Kumar, S. 2011. Spawn production technology. En Singh, M., Vijay, B., Kamal, S., Y Wakchaure, G. C. (eds) *Mushrooms: cultivation, marketing and consumption*. Pp 35-39. Directorate of Mushroom Research, Chambaghat, India.
- Stamets, P. 1993. Generating grain spawn. En Stamets, P.(ed), *Growing gourmet and medicinal mushrooms*. Pp 259 - 394. Ten speed press, Berkely, California.
- Sundarraaj, A. A., Y Ranganathan, T. V. 2018. A review on cellulose and its utilization from agro-industrial waste. *Drug Invention Today*, **10**(1): 89–94.
- Sutton, L. M., Y Starzyk, M. J. 1973. Procedure and analysis of a useful method in determining mycelial dry weights from agar plates. *Applied Microbiology*, **24**(6): 1011–1012.

- Taniwaki, M. H., Pitt, J. I., Hocking, A. D., Y Fleet, G. H. 2005. Comparison of hyphal length, ergosterol, mycelium dry weight, and colony diameter for quantifying growth of fungi from foods. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **571**: 49–67.
- Tay, C. Ch., Liew, H. H., Yin, C. Y., Abdul-Talib, S., Surif, S., Suhaimi, A. A., Y Yong, S. K. 2011. Biosorption of cadmium ions using *Pleurotus ostreatus*: growth kinetics, isotherm study and biosorption mechanism. *Korean J. Chem. Eng.* **100**(5): 648–653.
- Teytelman, L., Stoliartchouk, A., Kindler, L., Y Hurwitz, B. L. 2016. Protocols.io: virtual communities for protocol development and discussion. *PLoS Biology*, **14**(8): e1002538.
- Teixeira, J. L., Matos, M. P., Nascimento, B. L., Y Griza, S. 2018. Production and mechanical evaluation of biodegradable composites by white rot fungi. *Ciência e Agrotecnologia*, **42**(6): 676–684.
- Tišma, M., Sudar, M., Vasić-Rački, D., Y Zelić, B. 2010. Mathematical model for *Trametes versicolor* growth in submerged cultivation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. **33**(6): 749–758.
- Tjørve, K. M. C., Y Tjørve, E. 2017. The use of Gompertz models in growth analyses, and new Gompertz-model approach: an addition to the unified-richards family. *PLoS ONE*, **12**(6): 1–17.
- Tonetti, C., Y National, I. 2009. Determination of heavy metals in textile materials by atomic absorption spectrometry: verification of the test method. *Autex Research Journal*, **9**(2): 66-70.
- Varghese, L. M., Agrawal, S., Sharma, D., Mandhan, R. P., Y Mahajan, R. 2017. Cost-effective screening and isolation of xylano-cellulolytic positive microbes from termite gut and termitarium. *3 Biotech*. **7**(2): 108-115.
- Vicente-Saez, R., Y Martinez-Fuentes, C. 2018. Open science now: a systematic literature review for an integrated definition. *Journal of Business Research*, **88**: 428–436.
- Webster, J., Y Weber, R. W. S. 2015. Structure and morphogenesis of basidiocarps. In Webster, J., Y Weber, R. W. S (eds), *Introduction to fungi*. Vol. 3. Pp 517-519. Cambridge University press, New York.
- Yadav, J. S., Y Tripathi, J. P. 1991. Optimization of cultivation and nutrition conditions and substrate pretreatment for solid-substrate fermentation of wheat straw by *Coriolus versicolor*. *Folia Microbiol.*, **36**(3), 294–301.

- Yin, X., Goudriaan, J., Lantinga, E. A., Vos, J., Y Spiertz, H. J. 2003. A flexible sigmoid function of determinate growth. *Annals of Botany*, **91**: 361–371.
- Yoav, S., Salame, T. M., Feldman, D., Levinson, D., Ioelovich, M., Morag, E., Yarden, O., Bayer, E. A., Y Hadar, Y. 2018. Effects of cre1 modification in the white - rot fungus *Pleurotus ostreatus* pc9: altering substrate preference during biological pretreatment. *Biotechnology for Biofuels*, **11**: 1–16.
- Yusef, H. M., Y Allam, M. E. 1966. The effect of light on growth and sporulation of certain fungi. *Mycopathologia et Mycologia Applicata*, **33**: 81–89.
- Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., Y Van't Riet, K. 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*. **56**(6): 1875–1881.

ANEXO



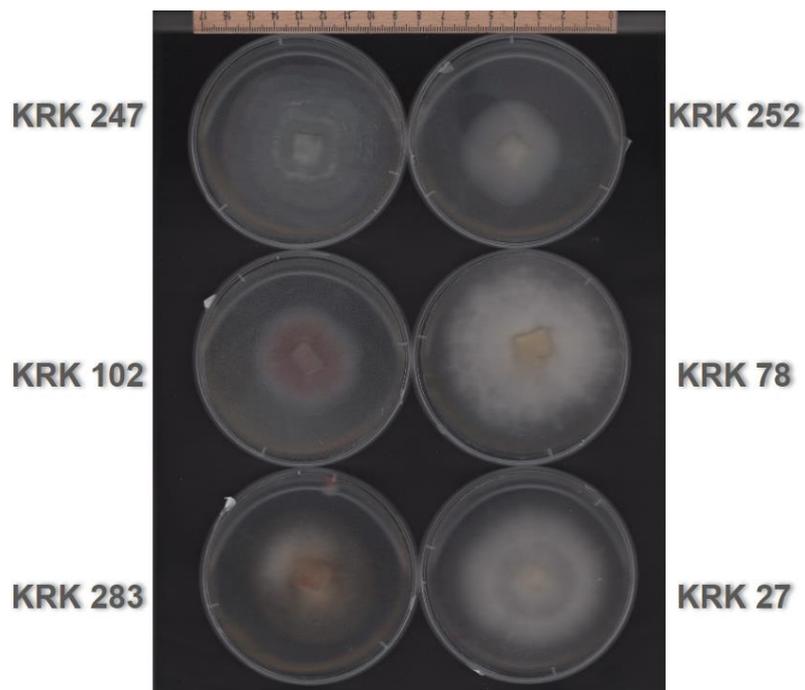
Anexo Figura 1. Biomateriales elaborados a partir del cultivo de cepa *Trametes versicolor* en una mezcla de cáscara de nuez con bagazo de cerveza. Cortesía de BioFab UC.



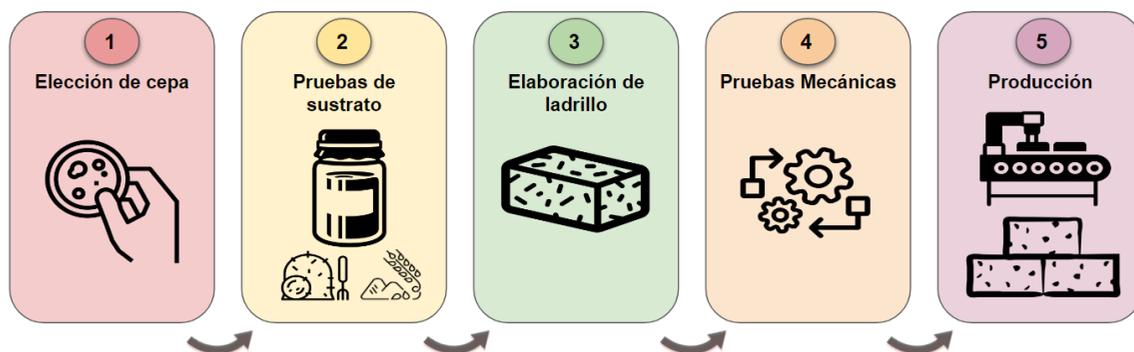
Anexo figura 2. Proyección tridimensional del montaje de las estructuras de Monumento Abierto. Cortesía de Anibal Fuentes.



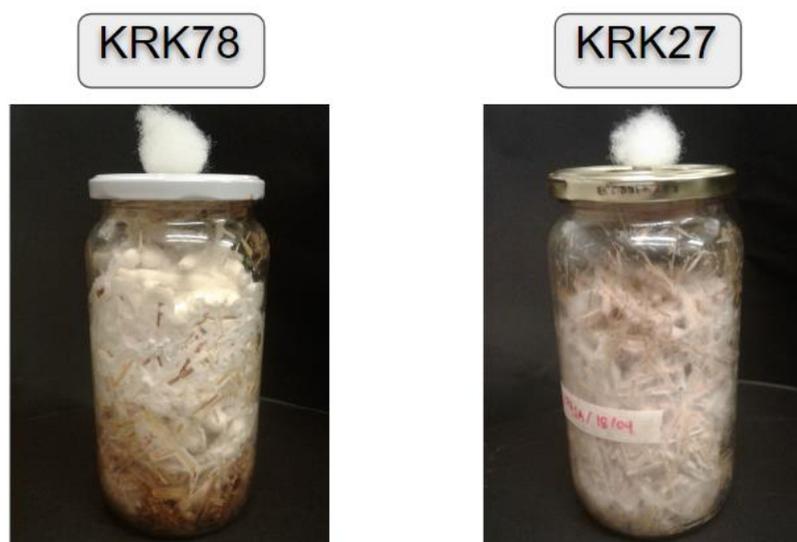
Anexo figura 3. Registro fotográfico de ladrillos generados durante el proceso productivo de Monumento Abierto. A) Ladrillos de micelio obtenidos a partir de la línea productiva de Monumento Abierto. B) Exposición de ladrillos en la Aparición Infinita del Museo del Hongo.



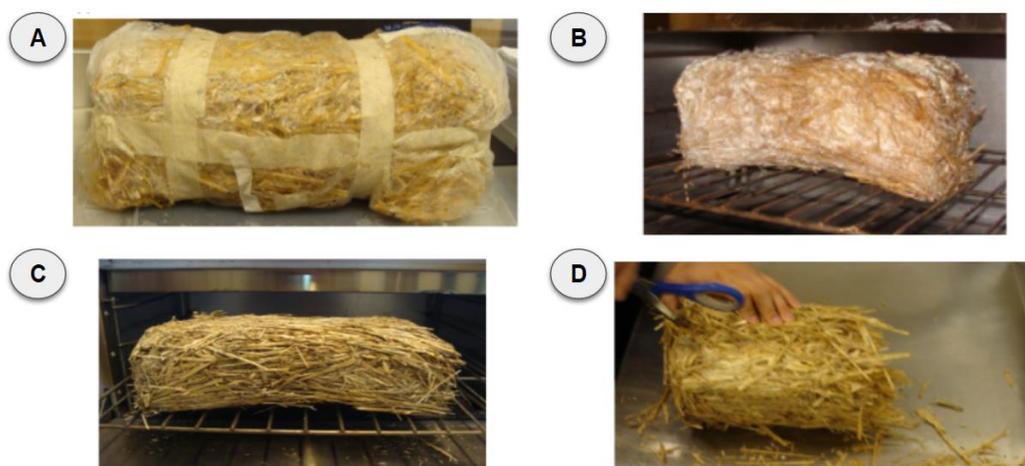
Anexo figura 4. Comparación de colonización en placa de 6 cepas del laboratorio BioFab. Todas las placas tienen 5 días de incubación desde su inoculación.



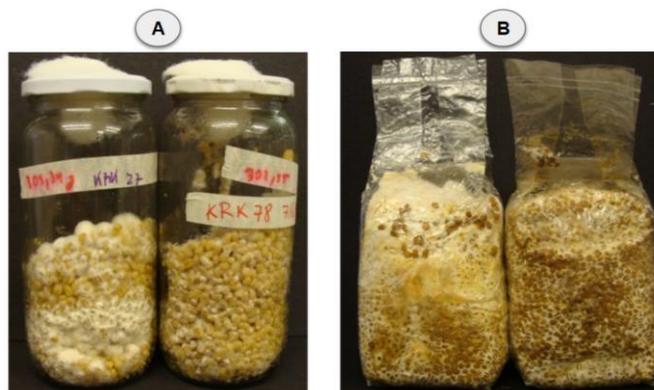
Anexo figura 5. Metodología lineal planteada a comienzos de MA para la producción de ladrillos de micelio.



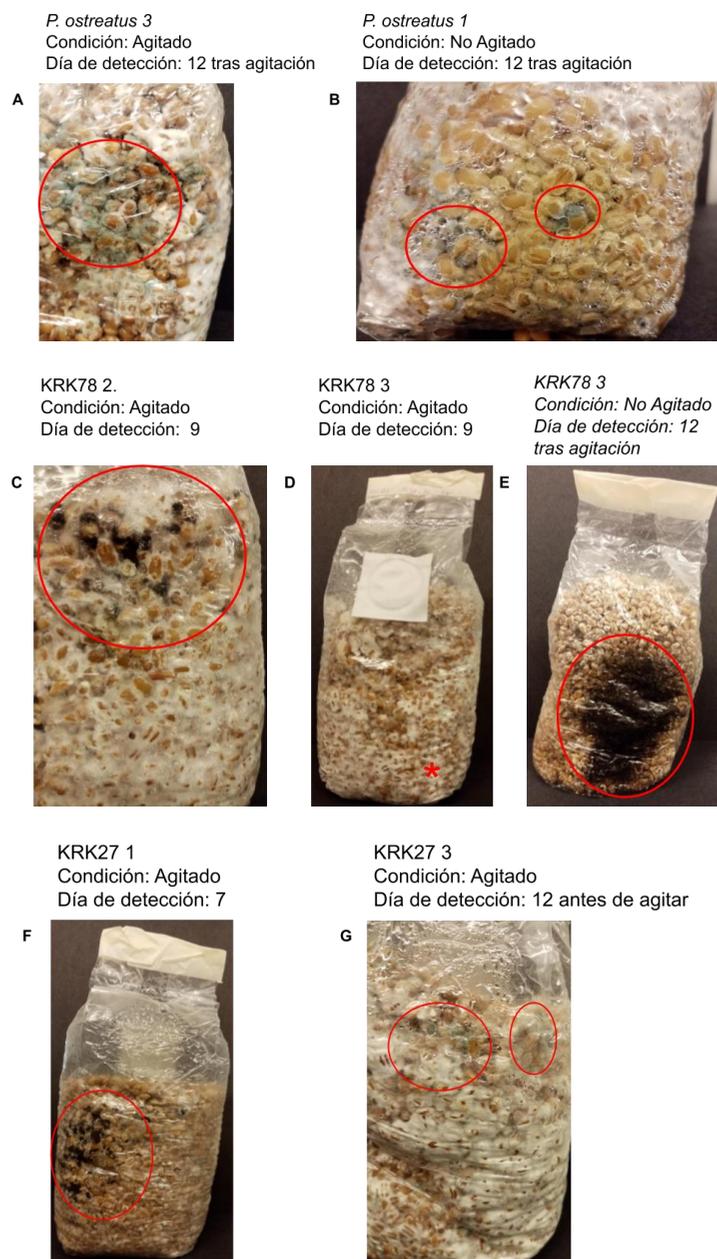
Anexo figura 6. Registro fotográfico a los 15 días de incubación desde la inoculación de las cepas KRK27 y KRK78 en paja de trigo.



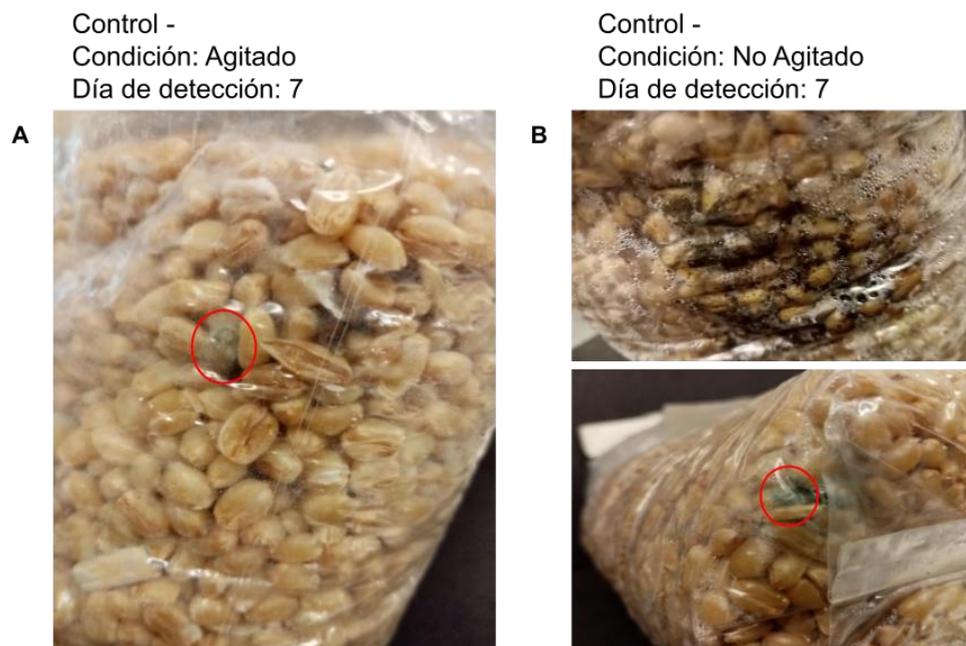
Anexo figura 7. Registro del proceso de horneado de un ladrillo de micelio. A) Ladrillo de paja inoculada con spawn de la cepa KRK78 empaquetado para su incubación. B) Ladrillo tras proceso de incubación y previo al horneado. C) Ladrillo tras horneado. D) Restos del ladrillo.



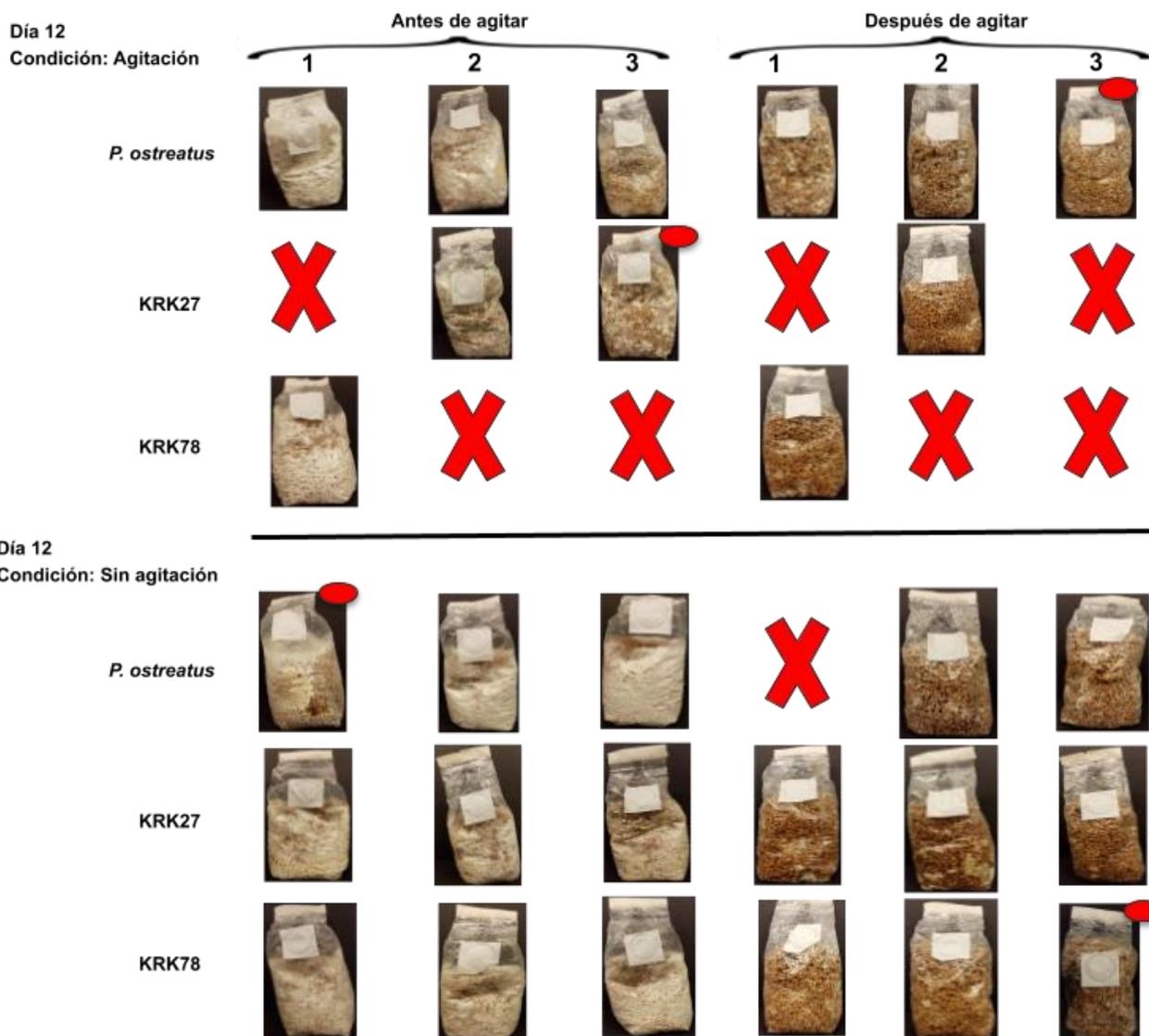
Anexo figura 8. Comparación de *spawn* generado en el laboratorio y producido por la empresa Micosecha. A) Comparación de *spawn* de las cepas KRK27 (izquierda) y KRK78 (derecha) producido en el laboratorio. B) Comparación de *spawn* de las cepas KRK27 (izquierda) y KRK78 (derecha) comercial.



Anexo Figura 9. Registro de contaminantes detectados en los *spawn* de *P. ostreatus* (A y B), KRK78 (C, D y E) y KRK27 (F y G). Se detalla la cepa fúngica, la condición aplicada durante la incubación (Agitado y No Agitado) y el día de la detección. En el caso de los contaminantes detectados el día 12, se detalla si fue antes o después de agitar el *spawn*. Las contaminaciones se englobaron en un círculo rojo en cada registro y para el caso de la réplica 3 de KRK78 en condición de agitación, se resaltó con un “*” debido a que se detectó un mal olor proveniente de la bolsa, siendo indicio de una fermentación por algún contaminante.



Anexo Figura 10. Registro de contaminantes detectados en los *spawn* que no fueron inoculados con micelio, utilizados como controles. La imagen A corresponde al *spawn* que fue agitado durante el periodo de incubación y la imagen B corresponde al *spawn* que no fue agitado durante el periodo de incubación.



Anexo Figura 11. Esquema de incidencia de contaminantes para los 3 hongos de estudio al día 12. Se presentan los *spawn* a los que se les aplicó el procedimiento de agitación (Condición: Agitación) y a los que no (Condición: Sin agitación) durante el periodo de incubación. Además, se presentan imágenes de todos los *spawn* después de haber sido agitados el último día (12). Se representan con una X roja los *spawn* que se descartaron de forma previa debido a la presencia de contaminantes y se marcaron con un círculo rojo los *spawn* que presentaron contaminantes el día 12 antes o después de la agitación.

Anexo Tabla 1. Registro de incremento radial (cm) en el tiempo para los hongos KRK27, KRK78, <i>Pleurotus ostreatus</i> , KRK252 y KRK283.									
Hongo	Diámetro (cm) por días de registro								
	3	4	5	6	7	10	12	14	17
KRK27	4,82 ^[1]	4,924	6,890	7,485	7,682	7,746	7,731	7,642	7,547
	4,409	5,933	7,126	7,802	7,812	7,370	7,506	7,601	7,941
	3,751	4,954	7,348	7,346	7,251	7,455	7,562	7,510	7,504
KRK78	4,965	5,937	7,184	7,639	7,811	8,075	7,782	7,660	7,515
	4,926	6,182	7,051	7,732	7,902	7,351	7,284	7,375	7,679
	4,713	6,291	7,232	7,439	7,806	7,391	7,380	7,385	7,393
<i>P. ostreatus</i>	2,232	3,236	4,099	5,098	6,204	7,236	7,407	7,188	7,052
	1,917	3,188	4,093	5,315	6,193	7,047	7,179	7,264	7,445
	1,939	3,088	3,794	4,337	5,116	6,895	7,393	7,290	7,178
KRK252	2,715	3,643	3,906	4,710	5,432	6,947	6,875	7,400	6,664
	2,914	3,671	4,329	5,284	6,269	7,042	7,531	7,325	7,440
	2,285	3,231	3,862	4,491	5,476	6,565	6,825	6,970	6,651
KRK283	0,638	0,792	1,065	1,166	1,358	1,583	1,648	1,543	1,605
	1,385	1,969	2,262	3,445	3,742	3,596	3,618	3,728	4,065
	0,873	1,323	1,657	1,921	1,902	2,229	2,128	2,258	2,335

[1]: Los valores numéricos corresponden a los registros de incrementos radiales de los hongos, obtenidos a partir de los datos de incremento de superficie asumiendo colonias circulares. La medición del incremento de superficie para cada cultivo se realizó mediante el software ImageJ. En la tabla 2 del anexo, se encuentran las desviaciones estándar

Anexo Tabla 2. Desviaciones estándar para los registros de incremento radial (cm) en el tiempo (días) para los hongos KRK27, KRK78, *Pleurotus ostreatus*, KRK252 y KRK283.

Hongo	Desviación estándar (cm) por días de registro								
	3	4	5	6	7	10	12	14	17
KRK27	0,539 ^[1]	0,574	0,229	0,234	0,294	0,197	0,117	0,068	0,241
KRK78	0,136	0,181	0,094	0,150	0,054	0,407	0,264	0,162	0,144
<i>P. ostreatus</i>	0,176	0,076	0,174	0,514	0,625	0,171	0,128	0,053	0,201
KRK252	0,321	0,246	0,258	0,410	0,471	0,252	0,394	0,230	0,452
KRK283	0,382	0,589	0,599	1,161	1,249	1,028	1,027	1,114	1,263

[1]: Los valores de las desviaciones estándar por día de registro, se obtuvieron a partir de las mediciones de incremento radial de colonia (diámetro) de la tabla 1.

Anexo Tabla 3. Análisis ANOVA unidireccional para el parámetro "A" del modelo de Gompertz basado en el test de Tukey con un porcentaje de confianza de 95% ($p < 0,05$).		
Comparación	Parámetros estadísticos	
	Valor p	Diferencias significativas
Global [1]	*** [2]	Si [3]
KRK27 vs KRK78	NS	No
KRK27 vs P. ostreatus	NS	No
KRK27 vs KRK252	*	Si
KRK27 vs KRK283	***	Si
KRK78 vs P. ostreatus	NS	No
KRK78 vs KRK252	NS	No
KRK78 vs KRK283	***	Si
P. ostreatus vs KRK252	NS	No
P. ostreatus vs KRK283	***	Si
KRK252 vs KRK283	***	Si

[1]: La columna de comparación plantea la evaluación realizada entre las cepas fúngicas utilizadas en el estudio. La fila "Global" indica si existen diferencias significativas en los valores de A entre los elementos del grupo (cepas).

[2]: Valores de p para cada comparación entre cepas fúngicas. *** = $p < 0,001$ | ** = $p < 0,01$ | * = $p < 0,05$ | NS= No Significativo ($p > 0,05$).

[3]: De acuerdo a los valores de p obtenidos, se determina si existen diferencias significativas para el parámetro A entre las especies comparadas.

Anexo Tabla 4. Análisis ANOVA unidireccional para el parámetro “m” del modelo de Gompertz basado en el test de Tukey con un porcentaje de confianza de 95% ($p < 0,05$).		
Comparación	Parámetros estadísticos	
	Valor p	Diferencias significativas
Global ^[1]	*** ^[2]	Si ^[3]
KRK27 vs KRK78	NS	No
KRK27 vs P. ostreatus	***	Si
KRK27 vs KRK252	***	Si
KRK27 vs KRK283	***	Si
KRK78 vs P. ostreatus	***	Si
KRK78 vs KRK252	***	Si
KRK78 vs KRK283	***	Si
P. ostreatus vs KRK252	NS	No
P. ostreatus vs KRK283	*	Si
KRK252 vs KRK283	NS	No

[1]: La columna de comparación plantea la evaluación realizada entre las cepas fúngicas utilizadas en el estudio. La fila “Global” indica si existen diferencias significativas en los valores de m entre los elementos del grupo (cepas).

[2]: Valores de p para cada comparación entre cepas fúngicas. *** = $p < 0,001$ | ** = $p < 0,01$ | * = $p < 0,05$ | NS= No Significativo ($p > 0,05$).

[3]: De acuerdo a los valores de p obtenidos, se determina si existen diferencias significativas para el parámetro m entre las especies comparadas.

Anexo Tabla 5. Análisis ANOVA unidireccional para el parámetro “m” del modelo de Gompertz basado en el test de Tukey con un porcentaje de confianza de 95% ($p < 0,05$).		
Comparación	Parámetros estadísticos	
	Valor p	Diferencias significativas
Global ^[1]	NS ^[2]	No ^[3]
KRK27 vs KRK78	NS	No
KRK27 vs <i>P. ostreatus</i>	NS	No
KRK27 vs KRK252	NS	No
KRK27 vs KRK283	NS	No
KRK78 vs <i>P. ostreatus</i>	NS	No
KRK78 vs KRK252	NS	No
KRK78 vs KRK283	NS	No
<i>P. ostreatus</i> vs KRK252	NS	No
<i>P. ostreatus</i> vs KRK283	NS	No
KRK252 vs KRK283	NS	No

[1]: La columna de comparación plantea la evaluación realizada entre las cepas fúngicas utilizadas en el estudio. La fila “Global” indica si existen diferencias significativas en los valores de m entre los elementos del grupo (cepas).

[2]: Valores de p para cada comparación entre cepas fúngicas. *** = $p < 0,001$ | ** = $p < 0,01$ | * = $p < 0,05$ | NS= No Significativo ($p > 0,05$).

[3]: De acuerdo a los valores de p obtenidos, se determina si existen diferencias significativas para el parámetro m entre las especies comparadas.