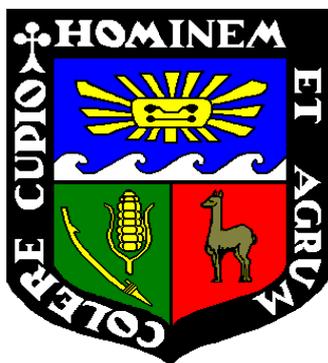


**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS



**“Producción de inóculo de *Pleurotus ostreatus* para uso
en biorremediación de suelos contaminados con
hidrocarburos de petróleo”**

Presentado por:

Enith Magaly Sifuentes Vásquez

Tesis para Optar por el Título Profesional de:

BIÓLOGO

Lima-Perú

2014

INDICE GENERAL

RESUMEN

I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
1. CONTAMINACIÓN DE SUELOS	4
1.1 PRINCIPALES CONTAMINANTES DEL SUELO	4
1.2 CONTAMINACIÓN DE SUELOS CON HIDROCARBUROS DE PETRÓLEO	5
2. BIORREMEDIACIÓN	6
2.1 TECNOLOGÍAS DE BIORREMEDIACIÓN <i>in situ</i>	7
2.2 TECNOLOGÍAS DE BIORREMEDIACIÓN <i>ex situ</i>	7
3. HONGOS Y NUTRICIÓN	9
3.1 HONGOS PARÁSITOS	9
3.2 HONGOS SIMBIONTES	9
3.2 HONGOS SAPRÓFITOS	10
4. USO DE HONGOS FILAMENTOSOS EN PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN	11
4.1 HONGOS DE PUDRICIÓN BLANCA	12
4.1.1 METABOLISMO DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS POR HONGOS DE PUDRICIÓN BLANCA	15
4.1.2 VENTAJAS DEL USO DE HONGOS DE PUDRICIÓN BLANCA	17
5. HONGO OSTRA O SETA <i>Pleurotus ostreatus</i>	18
5.1 GENERALIDADES	18
5.2 TAXONOMÍA	20
5.3 CULTIVO	20
5.4 PRODUCCIÓN DE INÓCULO (SPAWN)	21
6. ANTECEDENTES DEL USO DE <i>P. ostreatus</i> EN PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN	23
III. MATERIALES Y MÉTODOS	26
1. PROCEDIMIENTOS PREVIOS	26
1.1 CARACTERIZACIÓN DEL GRANO DE TRIGO Y CEBADA	26
1.2 PREPARACIÓN DEL GRANO	26
1.3 OBTENCIÓN DE CEPA	26
1.4 OBTENCIÓN DE MUESTRA DE CRUDO DE PETRÓLEO	26
2. PREPARACIÓN DE INÓCULO	26
2.1 CULTIVO DE CEPA DE <i>Pleurotus ostreatus</i>	26

2.2PREPARACIÓN DE INÓCULO PRIMARIO	27
2.3PREPARACIÓN DE INÓCULO SECUNDARIO	27
3. MEDICIÓN DE BIOMASA POR MICROSCOPIA	28
4. MEDICIÓN DE LA VELOCIDAD DE COLONIZACIÓN EN SUELO ..	29
IV.RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	31
1. CARACTERIZACIÓN DEL GRANO	31
2. ESTIMACIÓN DE BIOMASA POR MICROSCOPIA	31
2.1 ESTIMACIÓN DE BIOMASA EN INÓCULO PRIMARIO.....	31
2.2 ESTIMACIÓN DE BIOMASA EN INÓCULO SECUNDARIO.....	33
3. COLONIZACIÓN DEL MICELIO EN SUELO.....	37
3.1 ..COLONIZACION DEL SUELO POR INÓCULO SECUNDARIO DE TRIGO.....	37
3.2 .COLONIZACION DEL SUELO POR INÓCULO SECUNDARIO DE CEBADA	38
V. CONCLUSIONES	42
VI. RECOMENDACIONES	43
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
VIII. ANEXOS	53

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Costo de tratamientos de remediación	2
Cuadro 2. Tecnologías de Biorremediación	8
Cuadro 3. Factores que afectan el crecimiento de <i>Pleurotus spp</i>	21
Cuadro 4. Distribución de tratamientos para Estimación de Biomasa	28
Cuadro 5. Distribución de tratamientos para ensayo de Velocidad de Colonización ..	30
Cuadro 6. Contenido de carbono y nitrógeno de sustratos.....	31

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Análisis de Varianza (ANOVA) de la producción de biomasa del inóculo primario del hongo <i>P. ostreatus</i> con granos de trigo y cebada	32
Tabla 2. Análisis de Varianza (ANOVA) de la producción de biomasa del inóculo primario del hongo <i>P. ostreatus</i> con granos de trigo y cebada	35
Tabla 3. Prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Significancia estadística entre los niveles del factor tiempo.....	40

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reacciones iniciales en la degradación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en bacterias y hongos.	16
Figura 2. Vías metabólicas tentativas de algunos HAP en <i>P. ostreatus</i>	19
Figura 3. Pasos en la producción de Inóculo.	23
Figura 4. Cultivo de <i>P. ostreatus</i> en PDA.	27
Figura 5. Inóculo primario de trigo y cebada.....	28
Figura 6. Ensayo Biomasa.	29
Figura 7. Crecimiento de micelio en cultivos inoculados con agar.	32
Figura 8. Crecimiento de micelio en cultivos inoculados con grano.....	34
Figura 9. Niveles de colonización de suelo por inóculo de <i>P. ostreatus</i> producido con granos de trigo	38
Figura 10. Niveles de colonización de suelo por inóculo de <i>P. ostreatus</i> producido con granos de trigo	39

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Análisis de suelo: caracterización	53
Anexo 2. Informe de análisis especial en foliar.....	54
Anexo 3. Imágenes ensayo de colonización del suelo.....	56
Anexo 3. Análisis estadístico	58

RESUMEN

El uso de los hongos basidiomicetos en biorremediación ha cobrado mayor interés en los últimos años debido al amplio espectro de compuestos recalcitrantes que pueden degradar y/o absorber, así como su bajo costo y fácil manipulación (en comparación con el uso de bacterias). El presente trabajo buscó medir el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en medio sólido para producción de inóculo fúngico y el crecimiento de dicho inóculo en suelos contaminados con crudo de petróleo. La biomasa de *P. ostreatus*, cultivado en granos de trigo y cebada, fue medida por microscopia. Se logró producir inóculo del hongo *P. ostreatus* en granos de trigo y cebada, alcanzando una colonización total de dichos sustratos en cuatro semanas de cultivo. Se obtuvo un mayor crecimiento de micelio en el inóculo primario preparado con trigo, el cual alcanzó un crecimiento de 1210.40 m/g. En la producción de inóculo secundario se alcanzó un crecimiento de 106 000 cm/g y 105 3.60 m/g en trigo y cebada respectivamente, sin encontrarse diferencias significativas entre ambos granos. Adicionalmente, se midió la velocidad de colonización de los inóculos producidos, en suelo contaminado con crudo de petróleo a una concentración de 10 000 ppm. Se observó diferencias significativas en el diámetro de colonización entre los distintos tratamientos probados en la colonización del suelo, tanto con el inóculo de trigo como el de cebada. Los tratamientos con cebada alcanzaron mayores niveles de colonización en suelo, sin observarse incrementos significativos en el crecimiento del micelio al adicionarle suplementos de torta de soya y aserrín.

Palabras clave: *Hongos de pudrición blanca, Pleurotus ostreatus, Hidrocarburos de petróleo, Inóculo fúngico, Contaminación de suelos.*

I. INTRODUCCIÓN

La biorremediación es un método alternativo actualmente utilizado para la remoción de contaminantes ambientales utilizando sistemas biológicos. Estos pueden ser aplicados *in situ* sin la necesidad de remover o transportar el material contaminado, lo cual reduce costos y esfuerzo. Asimismo, éstas técnicas no producen otro tipo de contaminación durante su uso por lo cual son ampliamente aceptadas por el público (Demnerová, K. et al., 2005).

Diversos adelantos en los últimos años han ayudado a convertir la biorremediación en una herramienta importante en el control de la contaminación. Dentro de éstos avances se encuentran la utilización de un grupo de organismos con características ecológicas distintas llamados hongos de pudrición blanca (Bogan, BW. & Lamar, RT., 1996). La importancia de éstos organismos radica en su capacidad para degradar una gran variedad de contaminantes orgánicos y sustancias persistentes en el ambiente tales como clorofenoles, dioxinas, aminas aromáticas, fenoles organofosforados e hidrocarburos policíclicos aromáticos (Floriani, F., 2009; Moro, S. 2006; Soares, I. et al., 2011). Sin embargo, poco es conocido sobre los mecanismos utilizados por estos hongos para la oxidación de dichos compuestos (Hammel, KE., 1995).

Los hongos filamentosos presentan una serie de características que los hacen atractivos para su aplicación en sistemas de biorremediación de suelos con bajos requerimientos tecnológicos. Entre éstas están la capacidad que tienen de crecer bajo condiciones de estrés ambiental, lo cual limita el crecimiento bacteriano. Además, su modo de crecimiento permite la colonización de grandes áreas. De esta forma, el contacto superficial con el contaminante es amplio, aumentando su biodisponibilidad y consecuentemente incrementando su biodegradación (Da Silva, R., 2009).

Pleurotus ostreatus es un hongo de pudrición blanca de gran importancia económica, gastronómica y medicinal comúnmente conocido como hongo ostra o seta, es industrialmente producido como alimento de consumo humano siendo el tercer hongo más cultivado a nivel mundial (Cohen, R. et al., 2002). Este hongo en particular posee un complejo multienzimático degradador de compuestos ligninocelulósicos (Lacasas, Mn Peroxidasa, Glucosa oxidasa). La actividad de estas enzimas se ha aprovechado en procesos

de biorremediación para oxidar contaminantes como insecticidas, colorantes, herbicidas y fungicidas, entre otros (Gomes, K. & Roberto, D., 2006).

La contaminación de suelos y sedimentos como consecuencia de las actividades extractivas de hidrocarburos de petróleo, tiene importancia económica e implicaciones toxicológicas para las áreas contaminadas debido a que restringen o impiden su uso. Diversos estudios han demostrado el bajo costo de la biorremediación de suelos (Cuadro 1) en comparación con otros métodos de remediación tanto físicos como químicos además de provocar una menor intrusión en el sitio contaminado, reduciendo el daño ecológico durante el proceso de destrucción de contaminantes (Kosaric, 2001, Volke, T. & Velasco, J.A. 2002, Di Paloma, M. & Vicién, C., 2010). Dentro de este ámbito, la habilidad de los hongos de pudrición blanca para degradar un gran espectro de contaminantes ambientales los diferencia de muchos otros microorganismos usados en biorremediación.

Tratamiento	Costo por tonelada (dólares, EUA)
Depósito	140 - 200
Incineración	140 - 150
Estabilización/fijación	100 - 200
Biorremediación	15 - 17

Cuadro 1. Costo de tratamientos de remediación. Fuente: Kosaric, 2001

El hongo de pudrición blanca *Pleurotus ostreatus* es conocido por su capacidad como degradador de hidrocarburos, por lo tanto conseguir un sustrato correcto para su cultivo constituirá un gran avance en la producción de biomasa para propósitos de biorremediación. *P. ostreatus* es un hongo basidiomiceto perteneciente al grupo de los hongos de pudrición blanca, los cuales tienen la capacidad de degradar la compleja estructura de la lignina ocasionando el decaimiento de los árboles. Ésta capacidad degradadora se la deben a un complejo de enzimas extracelulares las cuales son a su vez capaces de degradar o mineralizar muchos compuestos orgánicos. Un factor muy importante para considerar a *P. ostreatus* como modelo para dichas investigaciones es el hecho que, a diferencia de otros hongos de pudrición blanca, *P. ostreatus* no es considerado patógeno y su cultivo está estandarizado para el cultivo humano.

Pese a todo lo mencionado anteriormente, en nuestro país no se han desarrollado metodologías para explotar el potencial de estos hongos en la recuperación de suelos. Asimismo, tampoco existen en el Perú, trabajos de caracterización de inóculo fúngico con fines de biorremediación ni metodologías para su empleo. Para alcanzar esto, el primer paso lo constituye la formulación de un inóculo que presente un adecuado crecimiento de micelio en los granos utilizados como soporte.

1. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.1 OBJETIVO GENERAL

- Producir inóculo de *Pleurotus ostreatus* y cuantificar su crecimiento para un posible uso en biorremediación de suelos.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la producción de biomasa del hongo *P. ostreatus* en granos de trigo y cebada.
- Medir el nivel de colonización del inóculo de *P. ostreatus* obtenido, en suelo contaminado con hidrocarburos.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

1. CONTAMINACIÓN DE SUELOS

La contaminación del suelo es un típico efecto de la actividad antropogénica y es causada por la producción industrial de colorantes, fibras sintéticas, preservantes de madera, extracción y gasificación de carbón vegetal, así como por los procesos de extracción, transporte, refinamiento, transformación y utilización del petróleo y sus derivados (Soares, I., 2011)

La contaminación del suelo significa la presencia de algún elemento o sustancia que puede afectar los componentes bióticos del ecosistema, comprometiendo su funcionalidad y sustentabilidad. La contaminación está ligada, además, a la concentración o cantidad de residuos incorporados en el suelo ya sea de manera accidental o intencional (Dias, S. et al., 2008).

Este tipo de contaminación surge a partir de un número de fuentes incluyendo el uso excesivo de fertilizantes y otros químicos en el suelo. Frecuentemente, la contaminación del suelo es ocasionada por el derrame o filtración de desechos en el suelo. El suelo contaminado puede ser una seria amenaza para las personas quienes entran en contacto con éste. Algunas veces la contaminación del suelo puede contribuir con la contaminación del agua. Esto ocurre a través de la escorrentía superficial, generalmente durante las lluvias cuando las masas contaminadas son llevadas cerca de los cuerpos de agua (Gresham T., sf)

1.1 PRINCIPALES CONTAMINANTES DEL SUELO

Nápoles y Ábalos, clasifican a los contaminantes del suelo en dos grupos: contaminantes orgánicos y contaminantes inorgánicos.

- a) **Contaminantes orgánicos.-** Entre éstos contaminantes se encuentran principalmente los contaminantes del grupo BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno), fenoles, policlorobifenilos (PCBs), hidrocarburos

policíclicos aromáticos (PAHs) y plaguicidas. Podemos encontrar estos contaminantes en cuatro formas distintas en el suelo. Estas formas pueden ser: vapor, disolución acuosa, líquido no acuoso o adsorbidos en los sólidos y coloides.

b) **Contaminantes inorgánicos.**- en este grupo destacan los metales pesados, los cuales a su vez se pueden clasificar en dos subgrupos:

- Tóxicos sólo a altas concentraciones, como el cobre, zinc, manganeso, hierro y cromo.
- Tóxicos a bajas concentraciones, dentro de los que se encuentran el cadmio, mercurio, plomo, níquel, selenio, arsénico.

1.2 CONTAMINACION DE SUELOS CON HIDROCARBUROS DE PETRÓLEO

La contaminación por hidrocarburos y productos derivados del petróleo constituyen una perturbación al ambiente debido a su naturaleza persistente y su tendencia a expandirse en el suelo y aguas superficiales.

El petróleo es una mezcla completa que contiene varios compuestos, siendo los hidrocarburos los que representan la fracción mayoritaria. Debido a la complejidad de esta mezcla, el tratamiento de las áreas contaminadas con estas sustancias es bastante difícil y problemática. De manera general, los compuestos que exigen una mayor preocupación ambiental son: benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (Almeida, J. et al., 2010).

Se sabe que los hidrocarburos de petróleo se incorporan al ambiente frecuentemente en grandes volúmenes y a través de diversas rutas. Una de las rutas más grandes es la filtración desde los depósitos naturales lo que ocasiona la aparición de petróleo en ambientes marinos. Otras rutas incluyen la producción, almacenamiento y transporte, el cual involucra un potencial significativo para el derrame accidental de hidrocarburos de petróleo (Singh, H., 2006).

Los derrames de hidrocarburos en la forma de productos de petróleo tanto en el suelo como en el agua han sido un problema desde el descubrimiento del petróleo como fuente combustible. Los derrames de petróleo y las descargas de desechos de petróleo en el mar por parte de las refinerías, fábricas o embarcaciones que contienen componentes tóxicos constituyen un potencial daño a los animales y plantas. Estos tóxicos pueden pasar a través de la cadena alimenticia de un área y ser ingeridos eventualmente por las personas (Pascucci, S., 2011)

En el suelo, los hidrocarburos impiden el intercambio gaseoso con la atmósfera, iniciando una serie de procesos físico-químicos simultáneos como evaporación y penetración, que dependiendo del tipo de hidrocarburo, temperatura, humedad, textura del suelo y cantidad vertida puede ser más o menos lentos, ocasionando una mayor toxicidad, además de tener una moderada, alta o extrema salinidad, dificultando su tratamiento (Benavides, J. et al., 2006).

2. BIORREMEDIACIÓN

La biorremediación es un método que consiste en la utilización de procesos o actividad biológica de organismos vivos (microorganismos y plantas) que posean la capacidad de modificar o descomponer determinados contaminantes, transformándolos en sustancias inertes (Soares, I. et al., 2011). Asimismo, se define como una “tecnología de biorrestauración de ambientes naturales previamente contaminados con xenobióticos, utilizando la capacidad metabólica de los microorganismos (bacterias, hongos, levaduras y algas) y algunas plantas, oxígeno y nutrientes para acelerar los procesos de biodegradación natural” (Nápoles, J. & Ábalos, A., SF.)

El fundamento de los tratamientos biológicos de suelos contaminados se basa en la mineralización de los contaminantes orgánicos, es decir, la capacidad de los microorganismos de transformar contaminantes orgánicos en CO₂, agua y biomasa (Berger, 2005). La biorremediación puede emplear organismos propios del sitio contaminado (autóctonos) o de otros sitios (exógenos), puede realizarse *in situ* o *ex situ*, en condiciones aerobias (en presencia de oxígeno) o anaerobias (sin oxígeno) (Volke, T. & Velasco, J.A., 2002). Según el lugar de aplicación del proceso de

remediación, se distinguen dos tipos de tecnologías: tecnologías de biorremediación in situ y tecnologías de biorremediación (Cuadro2).

2.1 TECNOLOGÍAS DE BIORREMEDIACIÓN *in situ*

Las técnicas in situ buscan estimular y crear un ambiente favorable para el crecimiento microbiano a partir de los contaminantes. Este objetivo generalmente puede lograrse con el suministro de aire u oxígeno (bioventeo), nutrientes (bioestimulación), microorganismos (bioaumentación) y/o humedad, además del control de temperatura y pH (EPA, 2001).

2.2 TECNOLOGÍAS DE BIORREMEDIACIÓN *ex situ*

Los procesos de biorremediación ex situ, incluyen a) procesos de biodegradación en fase de lodos, en donde el suelo se mezcla con agua (para formar un lodo), microorganismos y nutrientes; y b) procesos de biodegradación en fase sólida, en donde los suelos colocan en una celda de tratamiento (composteo) o sobre membranas impermeables (biolabranza), en donde se agrega agua y nutrientes (EPA, 2001).

La biorremediación es muy segura porque depende de los microorganismos que ocurren naturalmente en el suelo. Estos microorganismos son útiles y no presenta riesgo para las personas. Ningún químico peligroso es usado en biorremediación, los nutrientes agregados para permitir el crecimiento de los microorganismos son fertilizantes usados comúnmente en césped y jardines. Debido a que la biorremediación transforma los químicos dañinos en agua o gases inocuos, dichos químicos son completamente destruidos. (EPA, 2001)

Tipo	Tecnología de biorremediación	Características principales	Aplicaciones
<i>In situ</i>	Fitorremediación	Proceso que utiliza plantas para remover, transferir, estabilizar, concentrar y/o destruir contaminantes (orgánicos e inorgánicos) en suelos, lodos y sedimentos, y puede aplicarse tanto <i>in situ</i> como <i>ex situ</i> .	Suelos contaminados con BTEX; solventes clorados; HAP; desechos de nitrotolueno; agroquímicos clorados y organofosforados; Cd, Cr(VI), Co, Cu, Pb, Ni, Se y Zn; metales radioactivos y tóxicos de suelos y agua.
	Bioventilación	Suministro de aire en sitio contaminado a través de pozos de extracción, para proveer el oxígeno necesario para sostener la actividad de microorganismos degradadores	HTP, solventes no clorados, pesticidas y conservadores De la madera, entre algunos otros químicos.
	Biolabranza	La superficie del suelo contaminado es tratada por medio del arado. El suelo contaminado se mezcla suelo limpio y nutrientes, y se remueve periódicamente para favorecer su aireación.	Diesel, gasolinas, lodos aceitosos, PCP, creosota y coque, además de algunos pesticidas y HTP.
	Bioestimulación	Circulación de soluciones acuosas (que contengan nutrientes y/u oxígeno) a través del suelo contaminado, para estimular la actividad de los microorganismos autóctonos, y mejorar la biodegradación de contaminantes orgánicos o la inmovilización de contaminantes inorgánicos.	Gasolinas, COV, COS y pesticidas
	Bioaugmentación	Adición de microorganismos vivos, que tengan la capacidad para degradar el contaminante en cuestión, para promover su biodegradación o su biotransformación.	Herbicidas (2,4-D, clorofam), insecticidas (lindano, clordano, paratión), clorofenoles (PCP) y nitrofenoles, BPC, HTP y HAP.
<i>Ex situ</i>	Biorreactores (biorremediación en fase de lodos)	El suelo contaminado se mezcla constantemente con un líquido, y la degradación se lleva a cabo en la fase acuosa por microorganismos en suspensión o inmovilizados en la fase sólida. El tratamiento puede realizarse también en lagunas construidas para este fin o bien en reactores sofisticados con control automático de mezclado.	HTP, COS no halogenados y COV. Se utilizan también reactores secuenciales de lodos aerobios/anaerobios para tratar BPC, COS halogenados, pesticidas y desechos de artillería.
	Compostaje (biorremediación en fase sólida)	El material contaminado se mezcla con agentes de volumen (paja, aserrín, estiércol, desechos agrícolas) para mejorar el balance de nutrientes y que aseguran una mejor aireación y la generación del calor.	Suelos contaminados con PCP, gasolinas, HTP, HAP. Se ha demostrado también la reducción, hasta niveles aceptables, en la concentración y toxicidad de explosivos (TNT).

Cuadro 2. Tecnologías de Biorremediación (Elaboración propia)

3. HONGOS Y NUTRICIÓN

A diferencia de las plantas, los hongos son heterótrofos; al no tener clorofila no son capaces de producir su propio alimento mediante la fotosíntesis, por lo tanto éstos deben ser tomados de otras fuentes (Alexopoulos, C.J.; Mims, C.W. & Blackwell, M., 1996). El mecanismo de digestión de los hongos es externa, para lo cual secretan enzimas digestivas al medio, las cuales actúan degradando materia orgánica para producir moléculas más sencillas que puedan ser absorbidas como nutriente a través de la membrana y pared celular. Según la forma de adquirir sus nutrientes y energía (modelo de nutrición), los hongos se clasifican en tres grupos principales (Cisterna, C., 2003):

3.1 HONGOS PARÁSITOS

Son todos aquellos que obtienen sus nutrientes a partir de materia orgánica proveniente de otros seres vivos. Estos hongos, por lo general, causan enfermedades a otros organismos y muchos llegan a ocasionar la muerte de su huésped. Entre estos encontramos a los hongos fitopatógenos, que causan enfermedades a plantas cultivadas y los hongos dermatógenos que causan enfermedades en la piel humana, entre otros subgrupos. Entre los primeros encontramos a las Royas, Tizones, *Botrytis*, los Dihueños (*Cyrtaria spp.*) y más de mil especies diferentes, y entre los segundos encontramos a *Trichophyton* y *Candida* entre muchos otros.

3.2 HONGOS SIMBIONTES

Estos hongos establecen una asociación de beneficio mutuo con otros seres vivos. Entre estos encontramos a los micobiontes que forman parte de los líquenes y a las micorrizas que es una asociación establecida entre ciertos hongos y las raíces de vegetales, en la cual el hongo transporta agua, hormonas y ciertos nutrientes minerales a la planta, recibiendo a cambio azúcares y otras sustancias orgánicas producidas a consecuencia de la actividad fotosintética del vegetal.

3.2 HONGOS SAPRÓFITOS

Hongos saprófitos utilizan la materia orgánica muerta que se compone principalmente de polisacáridos de la pared celular y otros biopolímeros. Estos incluyen polímeros de la pared celular de origen vegetal (celulosa, hemicelulosa, lignina, pectina), polisacáridos de la pared celular de hongos (quitina) y polisacáridos de reserva de nutrientes (almidón) así como proteínas. Este grupo es muy importante en los ciclos de la mayoría de los macroelementos y sustancias indispensables para la vida.

La descomposición de la lignina es catalizada por un conjunto de oxidasas y peroxidasas con enzimas auxiliares que no solo proporcionan radicales hidroxilo, sino que también incluye la provisión de co-sustratos enzimáticos tales como ácidos orgánicos o alcoholes de arilo. La composición de los sistemas ligninolíticos es por lo tanto muy complejo y específico de cada especie. En comparación con la descomposición de la madera, se sabe mucho menos acerca de las especies de basidiomicetos que descomponen la hojarasca. Aparentemente están fisiológicamente relacionados con los descomponedores de la madera; sin embargo, la composición y regulación de sus sistemas ligninolíticos no está tan bien caracterizada, y poco se sabe de su enzimología en su ambiente natural (Boddy L., Frankland, J.C. & West, P. Van. 2007)

Básicamente existen tres subgrupos de Hongos Saprófitos (Stamets, P., 2005):

- **Degradadores Primarios** .- corresponde a los hongos colonizadores y que inician el proceso de degradación. Este grupo incluye especies del género *Pleurotus* “setas”, *Lentinula edodes* “shiitake” y *Grifola frondosa* “Maitake”. Sin embargo, estas especies poseen sistemas enzimáticos distintos para degradar la materia orgánica en diferentes estadios de descomposición.

- **Degradadores Secundarios**.- sólo pueden acceder a sustancias orgánicas más simples y que han sido pre-degradadas por los degradadores primarios. Los descomponedores secundarios trabajan en conjunto con los actinomicetos,

bacterias y hongos, incluyendo levaduras; en el suelo del bosque o en pilas de compost. El hongo más conocido perteneciente a este grupo es *Agaricus bisporus* “champiñón”.

- Degradadores terciarios.- este grupo difícil de categorizar incluye hongos que prosperan en hábitats creados por los descomponedores primarios y secundarios sobre un periodo de años fructificando normalmente en suelos con poca materia para descomponer. Dentro de este grupo se encuentran especies de géneros como *Conocybe*, *Agrocybe*, *Mycena*, *Pruteus* y *Agaricus*.

De los tres grandes grupos, sólo simbioses y saprófitos pueden ser cultivados bajo ambiente controlado ya que al ser independientes de otros seres vivos sólo basta desarrollar un sustrato lignocelulósico determinado y entregar las condiciones de temperatura, ventilación, humedad y luz adecuadas para lograr que estos hongos crezcan y fructifiquen. Si es un degradador primario sólo basta como sustrato varios tipos de desechos agroforestales frescos como pajas de cereales o aserrines y virutas, si se trata de un degradador secundario, el sustrato pueden ser los mismos tipos de desechos anteriormente indicados pero con un proceso de composteo previo.

4. USO DE HONGOS FILAMENTOSOS EN PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN

El uso de hongos para degradar o remover compuestos contaminantes del ambiente se conoce como micoremediación. Las prácticas de micoremediación involucran mezclar el micelio con suelo contaminado, colocación de matas de micelio sobre lugares tóxicos o una combinación de ambas técnicas en tratamientos sucesivos o de una sola aplicación (Statemets, P., 2005)

La mayoría del conocimiento que existe relacionado a las interacciones entre los hongos y los desechos está basado en estudios llevados a cabo en laboratorio. Sin embargo, durante la última década, los hongos han sido utilizados en el tratamiento de una amplia variedad de contaminantes y se ha establecido su rol en la

biorremediación de numerosos compuestos peligrosos y tóxicos en suelos y sedimentos (Singh, H., 2006).

Dentro de las moléculas orgánicas degradadas, descompuestas o transformadas por los hongos, se incluyen biomoléculas recalcitrantes de plantas, hidrocarburos policíclicos aromáticos, compuestos BETEX, tintes, pesticidas, componentes de efluentes e incluso cianuro. A diferencia de las moléculas orgánicas, los metales no pueden ser destruidos pero los hongos como otros microorganismos pueden causar una transformación entre sus formas móviles e inmóviles (Gadd, G. M., 2001)

4.1 HONGOS DE PUDRICIÓN BLANCA

Las especies que poseen las características más adecuadas para su empleo en procesos de micorremediación se encuentran dentro del grupo de los basidiomicetos (Martin Moreno, C. Gonzáles Becerra, A. & Blanco Santos, MJ. 2004). Estos basidiomicetos son conocidos como hongos de pudrición blanca y son los únicos organismos capaces de degradar y mineralizar la lignina. Si bien la mayoría de hongos de pudrición blanca pertenecen al grupo de los poliporáceos, éste es un grupo fisiológico más que taxonómico (Boyd-Wilson, K & Walter M., 2002).

En la naturaleza, estos hongos no utilizan la lignina como fuente de carbono sino que la oxidan y rompen para eliminar esa barrera química y poder acceder a los polisacáridos de la madera que sí constituyen una importante fuente de energía para ellos (Jeffries, TW., 1990). Las enzimas extracelulares utilizadas por los basidiomicetos saprotróficos para la toma de nutrientes, participan en interacciones interespecíficas con otros microorganismos del suelo pero también están involucrados en la transformación de material orgánico del suelo (Baldrian, P., 2008).

Los estudios de los sistemas ligninolíticos extracelulares de los hongos de pudrición blanca se han llevado a cabo desde la primera enzima aislada con capacidad ligninolítica en 1984 (Tien & Kirk, 1984). El entendimiento científico respecto a la degradación de lignina está incompleto, sin embargo la investigación relacionada a enzimas fúngicas secretadas en presencia de lignina natural y sintética ha avanzado suficiente como para implicar a las lacasas y peroxidasas de clase II como los tipos de

enzimas típicamente involucradas en la pudrición blanca (Darcy Young, MA. 2012)

El complejo de enzimas oxidasas y peroxidasas que poseen estos hongos, son las encargadas de catalizar las primeras reacciones que rompen uniones dentro de la molécula de la lignina y así generar moléculas más pequeñas. Posteriormente, se da una incorporación de estos productos de degradación a los ciclos metabólicos del organismo para dar como producto final agua y CO₂ (Papinutti, V. L et al., 2003)

Varios autores han demostrado la capacidad de ese organismo para degradar, además de lignina, un amplio espectro de contaminantes como el DDT, hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA), dioxinas y otros contaminantes organoclorados (Soares, I. et al., 2011) . Si bien la biodegradación de contaminantes recalcitrantes por enzimas fúngicas lignolíticas in vitro ha sido documentada; bajo condiciones in vivo, otros sistemas bioquímicos, procesos e interacciones pueden contribuir a la degradación (ej. Sistema citocromo P450 monooxigenasa, formación de radicales hidroxilos) o limitar la tasa de degradación (baja biodisponibilidad del contaminante debido a la adsorción de las partículas del suelo, hidrofobicidad de la molécula contaminante) (Novotny, C. et al., 2004).

Se ha estudiado la capacidad de estos hongos para degradar o modificar diferentes sustratos tales como, pulpas papeleras, clorofenoles, hidrocarburos policíclicos aromáticos, lignina kraft, sustratos lignocelulósicos, etc. (Quintero, J.C. et al., 2006, Pointing, S. B. 2001) siendo algunas de las especies más estudiadas y potentes: *Trametes versicolor*, *Grifola frondosa*, *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Phanerochaete chrysosporium* entre otras. (Statemets, P., 2005)

Esta capacidad única de los hongos de pudrición blanca para degradar la lignina se debe a la presencia de un sistema de enzimas lignolíticas extracelulares. Las mejor caracterizadas son la Lignina Peroxidasa (LiP), Manganese Peroxidasa (MnP) y Lacasa (LAC). El patrón de expresión de estas enzimas depende del organismo. Algunos secretan LiP y MnP sin producción de lacasas, mientras otros secretan MnP y lacasas pero no LiP (Hatakka, A., 1994). La habilidad de estas enzimas para degradar la lignina y otros compuestos recalcitrantes tales como compuestos aromáticos,

confirma su naturaleza inespecífica. Es precisamente en esa característica que radica el interés por su potencial aplicación en áreas como la industria del papel y/o la biorremediación (Gao, D. et al., 2010).

Actualmente, existe un gran potencial y expectativas altas en torno al uso de los basidiomicetos para biorremediación. Sin embargo, esta tecnología es poco apuntada como solución para la remediación a gran escala. Uno de los principales factores determinantes de su desempeño poco satisfactorio en campo, es el desenvolvimiento de un inóculo fúngico eficiente. La mayoría de los trabajos publicados sobre el asunto es direccionada esencialmente a los aspectos fundamentales de la degradación de contaminantes por los hongos con poca o ninguna atención a los aspectos aplicados de la tecnología, como la producción de inóculos o la ingeniería en campo (Seiti, W., 2010).

Pese a que la mayoría de estos estudios se centra en el metabolismo de contaminantes orgánicos, la investigación relacionada a la biodegradación enriquece también nuestro conocimiento sobre la ecología de los basidiomicetos saprófitos en el suelo. Esto a su vez contribuye a la identificación de factores ambientales que afectan la colonización del suelo, los requerimientos nutricionales, la fisiología de la producción de enzimas y la interacción con la microflora nativa (Baldrian, P. 2008)

La mayoría de los protocolos para utilizar los hongos de pudrición blanca en la biorremediación de suelos han sido adoptados de los cultivadores de hongos, quienes han perfeccionado el arte de producir *spawn* en residuos lignocelulósicos (Gadd, G. M., 2001). Una gran variedad de sustratos de bajo costo tales como astillas de madera, paja de trigo, coronta de maíz, aserrín, arroz, alfalfa, compost residual del cultivo de hongos, bagazo de caña de azúcar, pulpa de beterraga azucarera, pulpa de café, ciclodextrinas y surfactantes, pueden ser empleados para la producción de inóculo ex-situ e in-situ o mezclados con suelo contaminado para incrementar los niveles de degradación (Barr & Aust., 1994; Paszczyński & Crawford., 2000; Singh, H., 2006)

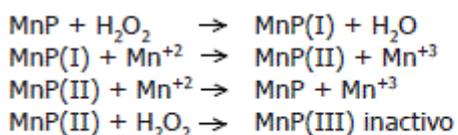
4.1.1 METABOLISMO DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS POR HONGOS DE PUDRICIÓN BLANCA

Los microorganismos degradan con facilidad los hidrocarburos lineales de la fracción alifática. Sin embargo, respecto a los hidrocarburos aromáticos, su degradación se va dificultando conforme aumenta el número de anillos y en consecuencia, su peso molecular (Solanas, AM. 2009). Es dentro de este punto que entran a tallar este grupo de hongos cuya capacidad para oxidar HAP ha sido demostrada, como por ejemplo en especies como *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* y *Pleurotus ostreatus* (Singh, H. 2006).

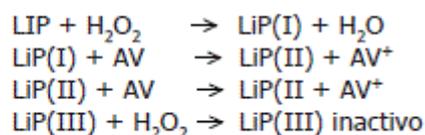
Pese a la continua investigación durante las últimas dos décadas, el conocimiento del metabolismo de los HAP por hongos es limitado, a comparación del conocimiento respecto a estos mecanismos en bacterias (Fig. 2) (Gadd, G. M. 2001). El principal efecto que provocan las enzimas ligninolíticas durante la degradación de la lignina, es la formación de radicales libres intermedios que ocurre cuando un electrón es removido o agregado de una estructura química en su estado más estable. Estos radicales libres son altamente reactivos y tienden a aceptar o ceder un electrón, lo que genera la oxidación o la reducción de compuestos alternos (Rubilar, H. 2007).

Las Manganese Peroxidasas ejercen su acción oxidativa indirectamente a través de la formación de radicales Mn^{+3} a partir del Mn^{+2} . El Mn^{+3} se estabiliza formando quelatos con ácidos carboxílicos los que actúan como mediadores eliminando electrones e hidrógenos inespecíficamente a moléculas orgánicas. Las Lignina Peroxidasas pueden ejercer por sí mismas la acción oxidativa o formar radicales libres a partir de algunos compuestos orgánicos como el alcohol veratrílico (AV) o el dimetoxibenceno (DMB) de manera análoga a como ocurre con las MnP. Los ciclos catalíticos de las enzimas peroxidasas (LiP y MnP) en su reacción con H_2O_2 para formar los radicales libres Mn^{+3} y AV^+ se presentan a continuación (Quintero, JC. 2011):

Ciclo de las MnP_s



Ciclo de las LiP_s



En el caso de la Peroxidasa versátil, su ciclo catalítico combina los ciclos de la Lip y la MnP. Es capaz de oxidar sustratos aromáticos a su correspondiente radical, el Mn^{3+} a Mn^{2+} y sustratos que la Lip solo oxida en presencia del alcohol veratrílico. Adicionalmente, el ciclo catalítico de la VP incluye la ustracción de dos electrones de la enzima en estado basal por el H_2O_2 para producir un radical catiónico (Rubilar, H. 2007).

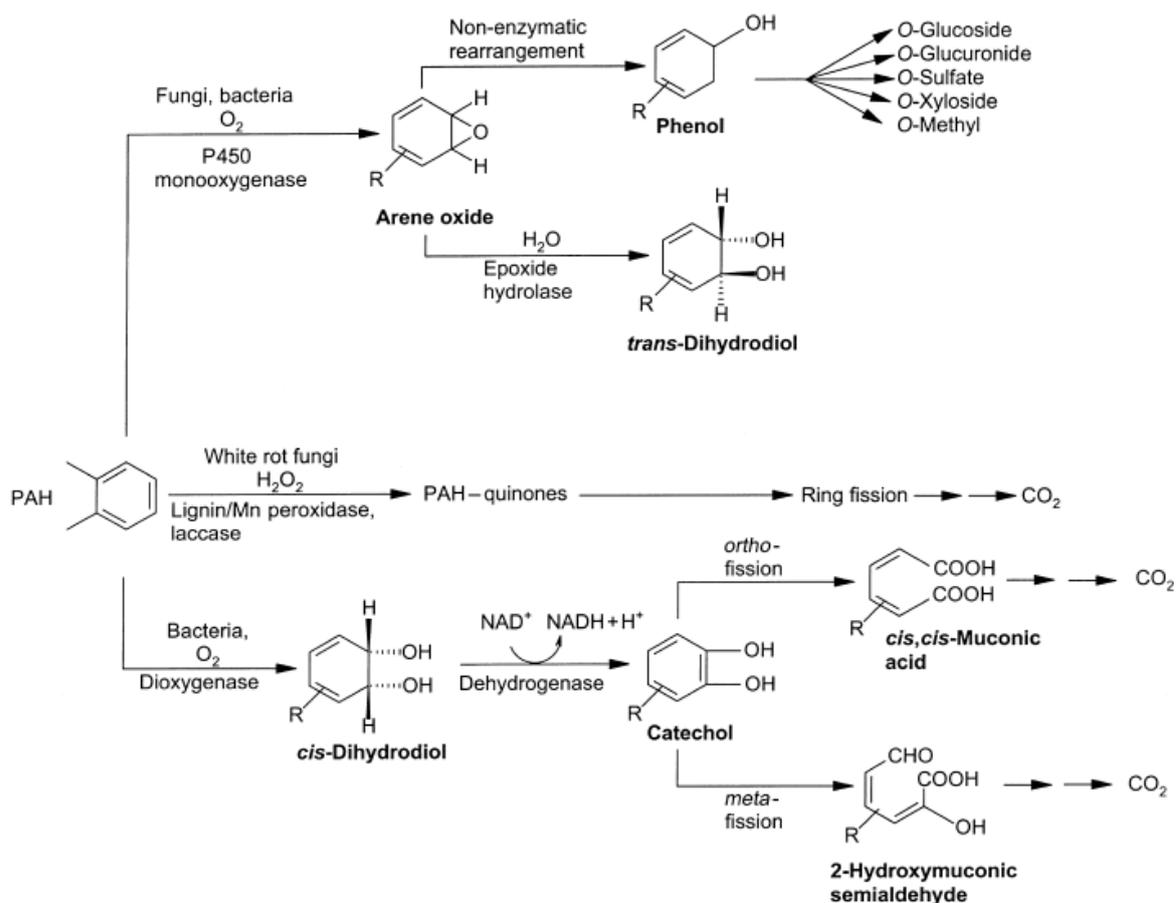


Figura 1. Reacciones iniciales en la degradación de los hidrocarburo aromáticos policíclicos (HAP) en bacterias y hongos. Fuente: Gadd, G. M. 2001. Fungi in Bioremediation

4.1.2 VENTAJAS DEL USO DE HONGOS DE PUDRICIÓN BLANCA

La tecnología de biorremediación de los hongos de pudrición blanca difiere de otros métodos de remediación, e incluso del uso de bacterias, debido a los inusuales mecanismos que poseen los cuales representan una serie de ventajas para la degradación de contaminantes. (Singh, H., 2006, Adenipekun C. O. & Lawal R., 2012):

1. Los hongos de pudrición blanca son abundantes en muchos ecosistemas.
2. Las enzimas clave del sistema de degradación de la lignina son extracelulares, lo cual obvia la necesidad de internalizar el sustrato y permite a los sustratos de baja solubilidad ser oxidados.
3. Estas enzimas permiten que los hongos toleren una concentración relativamente alta de contaminantes tóxicos.
4. Los hongos de pudrición blanca son capaces de degradar una amplia variedad de contaminantes debido a su mecanismo no específico de radicales libres.
5. Pueden ser empleados junto con sustratos lignocelulósicos de bajo costo, que pueden ser añadidos a los sitios contaminados para incrementar la degradación de contaminantes por estos mecanismos.
6. Su crecimiento es por extensión de hifas, permitiendo una eficiente colonización y exploración del suelo, por lo tanto pueden alcanzar contaminantes en el suelo en formas que otros organismos no.
7. A diferencia de las bacterias, no requieren un pre acondicionamiento al contaminante.

5. HONGO OSTRA O SETA *Pleurotus ostreatus*

5.1 GENERALIDADES

Pleurotus ostreatus es una especie de hongo saprófito perteneciente al grupo de los hongos de pudrición blanca mas estudiada debido a sus excepcionales propiedades lignolíticas, crecimiento rápido y fácil manejo bajo condiciones de campo.

Su micelio es blanquecino, de crecimiento radial, tornándose rápidamente de textura de algodón y conforme envejece forma una alfombra de micelio firme y delgado. El micelio envejecido generalmente secreta gotas amarillo-naranja de un metabolito que es una toxina para nematodos, la cual requiere un mayor estudio (Stamets, P., 1993).

En el caso de las setas el pie es lateral, debido a eso su desarrollo se da en forma de ostra u oreja. El término *Pleurotus*, deriva del griego “pleura” o “pleurón” que significa costado o lado y del latín “otus” que quiere decir oreja (Gaitán-Hernandez, R, et al., 2006). Sin embargo, para fines de esta investigación el hongo se trabajará a nivel microbiológico (micelio) sin llegar al desarrollo de cuerpos fructíferos.

A diferencia de otros hongos de pudrición blanca, *P. ostreatus* no produce Lignina peroxidasa sino que su habilidad para degradar lignina e hidrocarburos aromáticos policíclicos (Fig. 1) está relacionada con su actividad Lacasa y Manganeso Peroxidasa (Hatakka, 1990, Bezalel, L., Hadar, Y. & Cerniglia, C., 1996). *P. ostreatus* es efectivo contra una gran variedad de contaminantes tanto en medio líquido (Belzlalel, Hadar & Cerniglia, C., 1996b) como en sistemas suelo-lignocelulosa (Lang, Geller & Zadrazil, 1997; Martens & Zadrazil, 1998).

Asimismo, muchos estudios han demostrado que *P. ostreatus* inoculado en paja es superior a *Phanaerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor* en su habilidad para colonizar suelos (Martens & Zadrazil, 1998; Novotny et al., 1999).

En otro estudio, la paja de trigo también fue usada satisfactoriamente como soporte para introducir *P. ostreatus* en bandejas con suelos no estériles contaminados con HAPs y metales pesados al mismo tiempo (Baldrian et al., 2000).

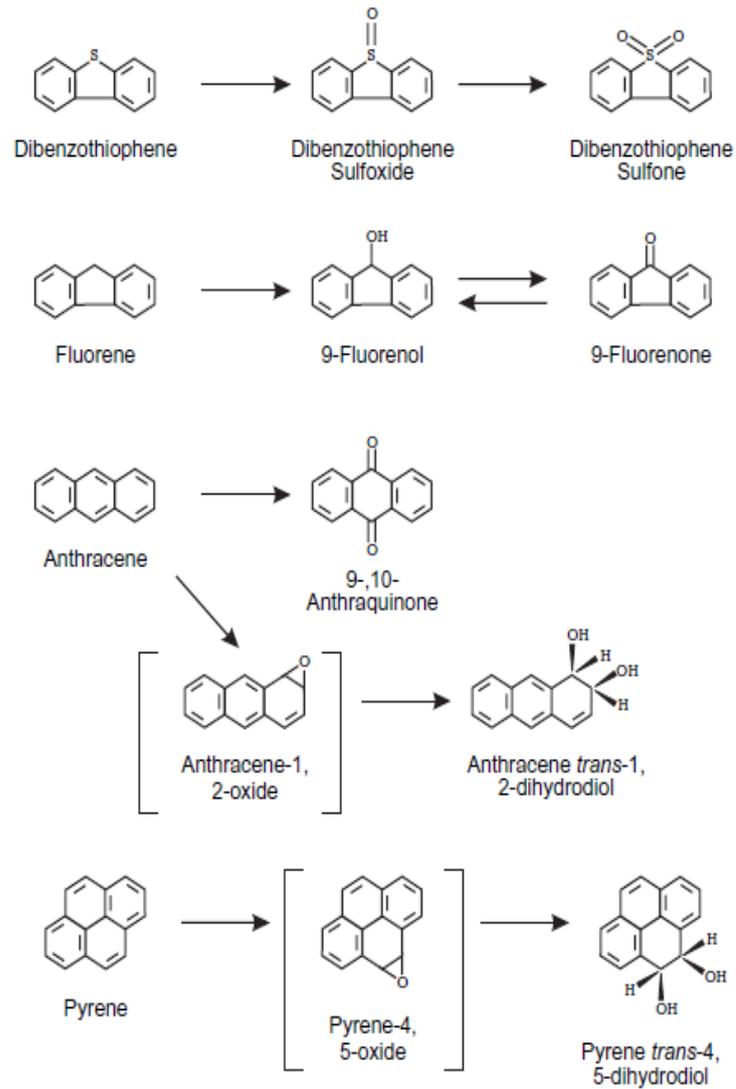


Figura 2. Vías metabólicas tentativas de algunos HAP en *P. ostreatus*. Fuente: Singh, H. 2006. Mycoremediation: Fungal Biorremediation.

5.2 TAXONOMÍA

Pleurotus ostreatus se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera (Base de datos taxonómica de UniProt):

Dominio: Eukaryota

Reino : Fungi

Phyllum: Basidiomycota

Clase: Homobasidiomicetos

Orden: Agaricales

Familia: Pleurotaceae

Género: *Pleurotus*

Especie: *Pleurotus ostreatus*

5.3 CULTIVO

Solo las especies de *Pleurotus* (el género más usado para la producción de hongos comestibles) poseen un bajo requerimiento de temperatura tanto para su crecimiento como para la producción de enzimas (Cuadro 3) y, en comparación a otras especies de hongos, son menos afectados por los organismos nativos del suelo (Hestbjerg et al., 2003).

El cultivo de *P. ostreatus* requiere un rango de temperatura entre 20 a 28°C, siendo la temperatura óptima de 25° C (Statemets, P., 2003; Gaitán-Hernandez, R., 2006; Mushworld, 2005) La colonización total del sustrato ocurre entre los 15 y 20 primeros días de iniciado el cultivo. Generalmente se realiza en bolsas de PVC, polietileno o polipropileno así como en botellas de vidrio (Kurtzman, R., 2005).

Para el crecimiento de *Pleurotus* se han citado rangos de crecimiento entre 4 y 7 de pH. Con un óptimo entre 5 y 6. Este valor sin embargo suele variar entre cepas y especies. Los sustratos ácidos (pH 4) pueden inhibir el desarrollo de *P. ostreatus* y *P. eryngii* y que estos hongos encuentran un pH óptimo en un rango entre 5.5 y 6.5 (Sanchez, J. et al., 2001).

Para el futuro se requiere una selección de especies de hongos con una capacidad competitiva tanto natural como obtenidas mediante ingeniería genética (Gao, D. et al., 2010). Actualmente, ya se han desarrollado sistemas eficientes de transformación genética para las setas *Pleurotus*, el champiñón *Agaricus*, y el Shiitake *Lentinula* los hongos comestibles de mayor importancia social, ecológica y económica (Sobal, M. et al., 2007).

Factor	Crecimiento del micelio	Fructificación
Temperatura	24° a 30°C	15° a 18°C
Luminosidad	Oscuridad	Luz indirecta (longitudes de onda menores a 600 nm) y un fotoperiodo de 12 horas
Humedad R.	30 a 40%	85 a 90%
Aireación	28% de CO ₂ , 20 % de oxígeno en el ambiente	20% de Oxígeno y menos de 700 ppm de CO ₂ en el ambiente.
pH	5-6 (bajo 4 existe inhibición)	5-6 (bajo 4 existe inhibición)

Cuadro 3. Factores que afectan el crecimiento de *Pleurotus spp.* Fuente: Sanchez, J., et al., 2001

5.4 PRODUCCIÓN DE INÓCULO (SPAWN)

El inóculo o *spawn* es el micelio vegetativo de un hongo seleccionado, crecido en un medio conveniente como trigo, mijo, sorgo etc., con la finalidad de obtener una cosecha de hongos. Involucra la preparación de un cultivo puro de hongo a partir de sus tejidos o esporas los cuales son mantenidos generalmente en agar seguido por su cultivo en granos esterilizados y más adelante multiplicados en más grano. El inóculo comprende entonces, el micelio del hongo y un medio de soporte que provee nutrición a éste durante su crecimiento (Sharma, V.P. & Kumar, S., 2011).

La elección de los granos o semillas para la producción de inóculo dependerá de su disponibilidad, bajo costo y calidad. Se pueden emplear semillas de sorgo, trigo, centeno, cebada, avena, mijo y arroz, entre otros (Gaitán-Hernández, R. et al., 2006). Además de grano se puede utilizar un soporte inerte que facilite la propagación del micelio como tarugos, aserrín, cartón o trocitos de madera, los cuales representan una ventaja para cultivo en exteriores (Stamets, P., 2005).

La elaboración de inóculo se realiza en dos etapas (Gaitán-Hernández, R. et al., 2006) (Fig 3):

- Inóculo primario.- es la propagación del micelio en semillas a partir de una cepa crecida en medio de cultivo.

- Inóculo secundario.- es la propagación del micelio en semillas a partir del inóculo primario, es decir, es la multiplicación del micelio para disponer de una mayor cantidad para su siembra en el sustrato elegido para la producción de hongos.

Entre las condiciones para la propagación del micelio a este nivel tenemos una humedad relativa entre 90-100%. El crecimiento más rápido se obtiene a una temperatura entre 25 y 28°C y se alcanza la colonización completa del sustrato entre los 10 y 14 días. Además se sugiere una incubación en total oscuridad (Statemets, 1993).

El cultivo y mantenimiento de basidiomicetos para la aplicación en los procesos de biorremediación y la elección de sustratos adecuados para la producción de inóculo son fundamentales para un buen desarrollo de estos hongos. Sin embargo, a pesar del gran número de estudios en biorremediación utilizando basidiomicetos, el tiempo exacto cuando el inóculo fúngico ha alcanzado las condiciones favorables para la degradación de contaminantes es aún desconocida. Normalmente, se considera que el inóculo está listo para usarse cuando el sustrato está visualmente colonizado con micelio fúngico. Asimismo, no se ha definido ningún parámetro para identificar la calidad del inóculo para la aplicación en este proceso (Ballaminut , N. & Matheus, D. R., 2007).

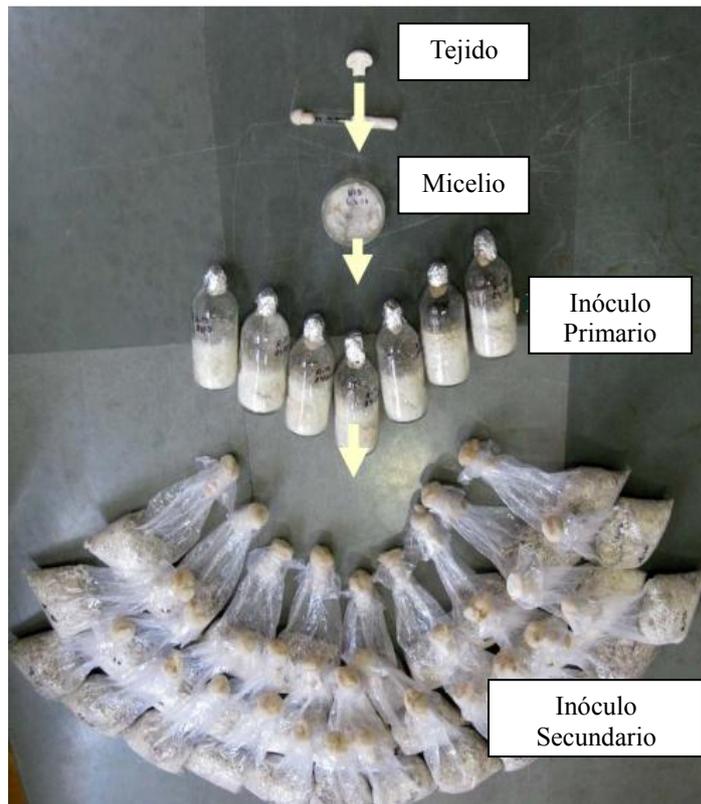


Figura 3. Pasos en la producción de Inóculo. Fuente: Sharma, V.P. & Kumar, S. 2011

6. ANTECEDENTES DEL USO DE *P. ostreatus* EN PROCESOS DE BIORREMEDIACIÓN

En la última década se han realizado estudios para probar la degradación de diversos hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) por el hongo *Pleurotus ostreatus* en suelo contaminado tanto natural como artificialmente. En uno de estos estudios llevado a cabo en el 2000, *P. ostreatus* logró metabolizar 4 HAP adsorbidos en suelo: 50% de pireno, 68% de antraceno y 63% de fenantreno, todos en 21 días de ensayo. Para realizar estos ensayos se utilizó *spawn* de trigo para inocular el suelo. Se pudo determinar además que al agregarse 0.15% de Tween 40, la biodegradación incrementó a 75%, 80% y 75%, de la concentración inicial respectivamente. La biodegradación de pireno en presencia de surfactante y H₂O₂ (1.0 mM) alcanzó un 90%. El Benz[a]pireno también fue oxidado por *Pleurotus ostreatus* pero no fue mineralizado (Marquez-Rocha, F., Hernandez-Rodriguez, V. & Vázquez- Duhalt, R. 2000).

Se ha descrito los efectos del hongo *P. ostreatus* en compuestos policíclicos aromáticos (CAP) en un experimento a escala de campo con suelos reales contaminados procedentes de un astillero clausurado y de una vieja fábrica de asfalto y brea. Se utilizó un control, un tratamiento con aserrín y uno con sustrato usado del cultivo de *P. ostreatus*. Se cuantificaron los CAP y la actividad lacasa comprobándose que el sustrato usado del cultivo de *P. ostreatus* tiene potencial para propósitos de biorremediación (Hestbjerg H., Arentsen P., Christensen, M., Andersen, O. & Jacobsen, C.S., 2002).

El hongo de pudrición blanca *Pleurotus ostreatus* también ha sido utilizado para biorremediación del sedimento del río Mahoning, históricamente contaminado con PAHs. En este estudio, *P. ostreatus* fue cultivado en cebada y los tratamientos utilizados incluyeron aserrín, papel periódico rasgado, una fuente de nitrógeno y ciclodextrina. El tratamiento más efectivo fue el que adicionó el hongo de pudrición blanca, aserrín, nitrógeno y ciclodextrina, el cual mostró una degradación de más del 50% de 9 de los 11 HAP con una degradación del 90% de los benzo(b&k)fluorenos. La biomasa fúngica total se incrementó en todos los tratamientos donde se adicionó *P. ostreatus* y el tratamiento que presentó mayor biomasa coincidió con el que presentó una mayor degradación (Bosiljcic, GR, Gacura, MD & Johnston, CG. 2008)

En otro estudio, sobre sedimentos del río Mahoning, se adicionó *Pleurotus ostreatus* cultivado en grano de cebada sobre dicho sedimento contaminado y fue suplementado con aserrín, con y sin fuente de nitrógeno y ciclodextrina. Las concentraciones totales de HAP (en el orden de ppm) fueron analizadas usando un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GCMS), éstas concentraciones disminuyeron significativamente en aproximadamente 50-60% en todos los tratamientos. Los datos obtenidos indicaron que existe un gran potencial para la biorremediación de sedimentos contaminados con HAPs mediante la estimulación de bacterias autóctonas bajo condiciones anaeróbicas seguida de la adición de hongos de pudrición blanca (Gacura, M., 2009).

Se han utilizado también cepas de *P. ostreatus* var florida para tratamiento ex situ y en laboratorios de suelos contaminado de zonas de derrame. Para estos ensayos se utilizaron muestras esterilizadas y no esterilizadas de suelo y se determinó la

concentración de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) mediante técnicas cromatográficas, antes y después del tratamiento con el hongo. Se observó la actividad del hongo *P. ostreatus* como degradador de los hidrocarburos presentes, y al trabajar con suelos esterilizados, se determinó que por si sólo es capaz de degradar los hidrocarburos hasta en un 97%, y en interacción con la flora bacteriana autóctona presente en bajas cantidades, se logra degradar los HTP en un porcentaje similar pero en tiempo menores a los utilizados en otras investigaciones, demostrando así su potencial como biodegradador de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo (Déley, A., 2010).

Asimismo, el sustrato usado proveniente del cultivo de *P. ostreatus* también ha sido usado para tratar cortes de perforación que contenían HAP en condiciones de laboratorio. Se probaron cuatro opciones de los diferentes niveles de tratamiento en reactores de plástico conteniendo cantidades fijas de cortes de perforación y una cubierta de suelo fresco inoculado con diferentes cantidades de sustrato usado del cultivo de *P. ostreatus*. Los resultados mostraron que este sustrato es adecuado para el tratamiento de estos cortes. Luego de 56 días de compostaje la degradación total de HAP fue entre 80.25 y 92.38%. La degradación individual de HAP estuvo en un rango de 97.98% en ancaftreno a 100% en fluoreno, fenantreno y antraceno. Estos resultados demostraron que el sustrato usado de cultivo de *P. ostreatus* puede ser adecuado para biotratar cortes de perforación contaminados con HAP (Okparanma, R., Josiah, N., Ayotamuno, M., Davis, D. & Allagoa M., 2011).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. PROCEDIMIENTOS PREVIOS

1.1 CARACTERIZACIÓN DEL GRANO DE TRIGO Y CEBADA

La determinación de contenido de carbono orgánico total, nitrógeno total y porcentaje de humedad de los dos tratamientos usados se realizó en el Laboratorio de Suelos de la Facultad de Agronomía de la UNALM.

1.2 PREPARACIÓN DEL GRANO

Los granos de trigo y cebada se hidrataron durante 12 horas, se dejaron secar 8 horas y luego se esterilizaron a 121°C y 15lb durante 30 minutos en bolsas de polipropileno de 5x10cm.

1.3 OBTENCIÓN DE CEPA

La semilla o “spawn” de *P. ostreatus* se obtuvo de la Clínica de Diagnóstico de Fitopatología y Nematología de la Universidad Nacional Agraria La Molina.

1.4 OBTENCIÓN DE MUESTRA DE CRUDO DE PETRÓLEO

La muestra de crudo de petróleo #5218 se obtuvo como donación del laboratorio de la Facultad de Ingeniería de Petróleo, Gas Natural y petroquímica de la Universidad Nacional de Ingeniería.

2. PREPARACIÓN DE INÓCULO

2.1 CULTIVO DE CEPA DE *Pleurotus ostreatus*

Se cultivó la cepa del hongo *P. ostreatus* en placas Petri de 9cm de diámetro con Agar Papa Dextrosa (PDA) a 26°C durante 14 días (hasta que el micelio colonizara toda la placa) en oscuridad (Fig.4). Al cabo de este periodo las placas

obtenidas se dividieron en 8 secciones radiales iguales a ser utilizadas en la inoculación de grano.



Figura 4. Cultivo de *P. ostreatus* en Agar Papa Dextrosa (PDA)

2.2 PREPARACIÓN DE INÓCULO PRIMARIO

Para propagar el micelio en grano se utilizó un octavo de placa con micelio diluido en 10 ml de medio líquido papa dextrosa (PDB). Cada bolsa de tratamiento se inoculó con 10 ml de esta preparación. Las bolsas de polipropileno de 5x10cm fueron incubados en una estufa eléctrica a 25°C durante 4 semanas (adaptado de Stamets, P., 2000).

2.3 PREPARACIÓN DE INÓCULO SECUNDARIO

Una vez obtenido el inóculo primario (Fig. 5), éste se utilizó para volver a inocular un nuevo grupo de granos de trigo y cebada preparados y esterilizados siguiendo el mismo procedimiento que para la obtención del inóculo primario. Esta segundo grupo de bolsas con grano inoculado se incubará bajo las mismas condiciones que el inóculo primario. Una vez finalizado el tiempo de cultivo, a estos segundos paquetes de grano colonizado por el micelio del hongo se les denomina inóculo secundario.



Figura 5. Inóculo primario de trigo y cebada

3. MEDICIÓN DE BIOMASA POR MICROSCOPIA

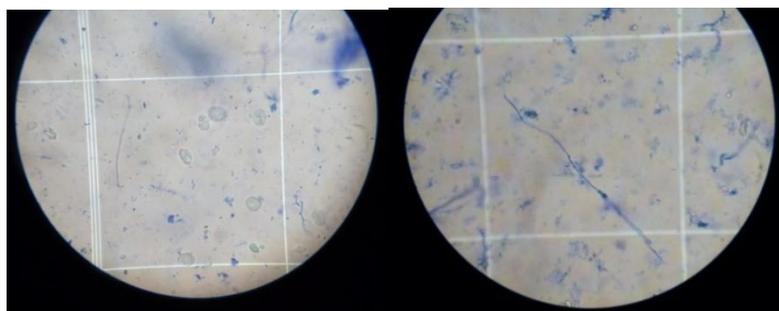
Con la finalidad de evaluar la producción de biomasa del hongo *Pleurotus ostreatus* en granos de trigo y cebada se realizó el ensayo de estimación de biomasa por microscopía (Cuadro 4), en el cual se midió el crecimiento del micelio en m de hifa/g grano; a la segunda, tercera y cuarta semana de cultivo. Se utilizaron dos grupos de cultivo para este ensayo, 1) grano inoculado con agar (inóculo primario) y 2) grano inoculado con inóculo primario (inóculo secundario).

Los tratamientos y controles se distribuyeron como se indica a continuación y se realizaron 3 repeticiones por tratamiento.

Control 1	Control 2	T1	T2	T3	T4
200gr trigo pelado	200gr cebada sin pelar	200gr trigo pelado + 10ml inóculo líquido	200gr cebada sin pelar + 10ml inóculo líquido	200gr trigo Pelado + 10 g inóculo primario	200gr cebada sin pelar + 10 g inóculo primario

Cuadro 4. Distribución de tratamientos para Estimación de Biomasa

Se tomó muestras de ambos tratamientos en 4 tiempos: t_1 = día 7, t_2 = día 14, t_3 = día 21 y t_4 = día 28 con las cuales se prepararon diluciones 1/25 de utilizando una Licuadora comercial *Waring 31BL92*. Se tomó 0.9 ml de cada dilución en un tubo de prueba y se tiñó con una gota de azul de metileno. Se tomó un volumen con una pipeta Pasteur de vidrio para colocar la muestra en una cámara de conteo Neubauer. Las diluciones de observaron bajo un microscopio óptico *Micros MC 200A* en una cámara de Neubauer *Hausser Scientific*, utilizando tinción con azul de metileno. Se registraron imágenes digitales de las observaciones en el microscopio (Fig 4) y posteriormente éstas fueron procesadas con el software *Universal Desktop Ruler versión 3.0.1211*. Utilizando dicho software, se midió la longitud de hifas en cada muestra y dicho valor fue convertido posteriormente a cm/ml.g (Adaptado de Gacura, M., 2009).



**Figura 6. Ensayo Biomasa. Izq: muestra inóculo de trigo.
Der: muestra inóculo cebada**

4. MEDICIÓN DE LA VELOCIDAD DE COLONIZACIÓN EN SUELO

Para este ensayo se utilizó una muestra de suelo franco ácido proveniente de la provincia de Tingo María en el departamento de Huánuco (Anexo 1). El suelo recibió un tratamiento previo de secado, desagregado y tamizado. Luego fue humedecido hasta alcanzar una humedad de 33% y se contaminó con petróleo crudo para alcanzar una concentración de 10 000 ppm. Utilizando el suelo contaminado (no esterilizado) se prepararon los tratamientos y controles en placas Petri de 9 cm de diámetro (Cuadro 2). Finalmente, tanto los tratamientos como los controles se inocularon con 3 granos de inóculo secundario. Los granos se colocaron en el centro de las placas formando un triángulo y se incubaron durante 12 días a 22° C. Se midió el crecimiento radial del micelio en cm/semana (Johnston, C. 2011; Juscamaita, J. 2011).

Se utilizaron dos controles y tres tratamientos como se indica en el cuadro 2, realizándose tres repeticiones para cada tratamiento. Se midió el diámetro de crecimiento de las colonias dentro de cada placa (tres colonias por placa) y se halló un promedio de éstas. Se registró la colonización del suelo los días 4, 8, 12, 16 de incubación.

Control 1	Control 2	T1	T2	T3
40 g suelo no estéril	40 g suelo no estéril + petróleo crudo 10 000 ppm	40 g suelo no estéril + inóculo secundario + petróleo crudo 10 000 ppm	40 g suelo no estéril + inóculo secundario + petróleo crudo 1 0000 ppm + torta de soya 1%	40 g suelo no estéril + inóculo secundario + petróleo crudo 10 000 ppm + aserrín 10%

Cuadro 5. Distribución de tratamientos para ensayo de Velocidad de Colonización.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

1. CARACTERIZACIÓN DEL GRANO

El porcentaje de carbono, porcentaje de nitrógeno y tasa C/N proveniente del análisis especial en foliar de los granos de trigo y cebada, se muestra en la siguiente tabla.

	Cebada	Trigo
% N	1.21	1.85
% C	56.44	56.83
Tasa C/N	47	31

Cuadro 6. Contenido de carbono y nitrógeno de sustratos.

2. ESTIMACIÓN DE BIOMASA POR MICROSCOPIA

2.1 ESTIMACIÓN DE BIOMASA EN INÓCULO PRIMARIO

El crecimiento de micelio entre la semana dos y cuatro, bajo el sistema de inoculación de agar PDA a grano se expresó en longitud de hifa m/ gramo de grano y está representado en la figura 5. El crecimiento máximo alcanzado por los cultivos en trigo y cebada fue de 1210.40 m/g y 67 3.08 m/g respectivamente.

En los sistemas de cultivo inoculados con inóculo primario, se observó un mayor crecimiento del micelio en granos de trigo entre la semana dos y cuatro; hallándose diferencias significativas en el crecimiento del micelio en la tercera y cuarta semana. Todas las pruebas se realizaron tomando como nivel de significancia de 0,05 (Tabla 1). No se evaluó el crecimiento en la primera semana del cultivo debido a que la proliferación del micelio en los granos era aún muy pobre y éste no era detectable al microscopio

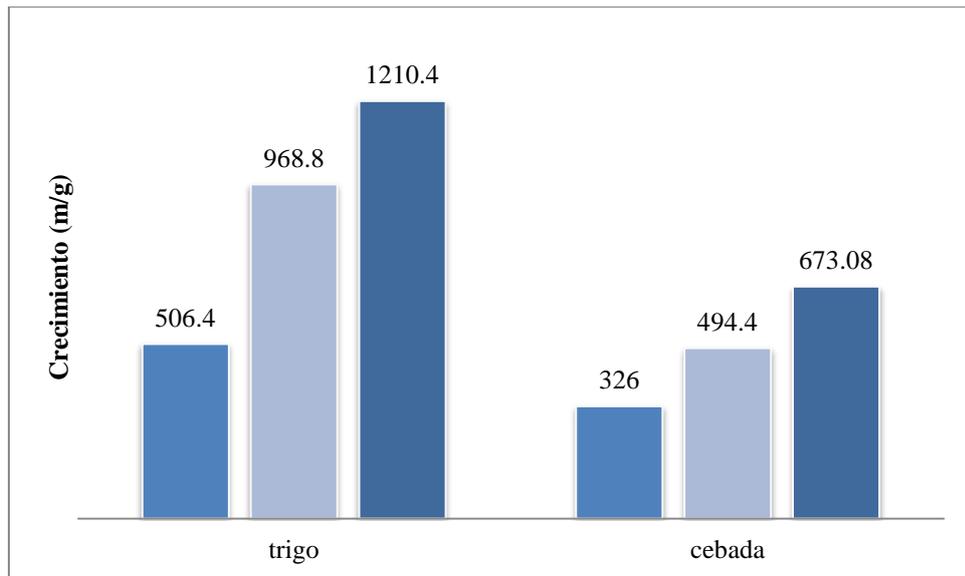


Figura 7. Crecimiento de micelio en cultivos inoculados con micelio propagado en agar papa dextrosa (PDA). ■ Segunda semana, ■ tercera semana, ■ cuarta semana.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
D14	Inter-grupos	1,627E7	1	1,627E7	4,275	,053
	Intra-grupos	6,851E7	18	3806124,444		
	Total	8,478E7	19			
D21	Inter-grupos	1,125E8	1	1,125E8	9,595	,006
	Intra-grupos	2,111E8	18	1,173E7		
	Total	3,236E8	19			
D28	Inter-grupos	1,444E8	1	1,444E8	13,546	,002
	Intra-grupos	1,918E8	18	1,066E7		
	Total	3,362E8	19			

Tabla 1: Análisis de Varianza (ANOVA) de la producción de biomasa del inóculo primario del hongo *P. ostreatus* con granos de trigo y cebada.

Se observó además una colonización más rápida de los granos de trigo por parte del hongo *P. ostreatus* así como el desarrollo de un micelio más denso, en comparación con el micelio crecido en los granos de cebada. Debido a que en estos sistemas la única fuente de nutrientes es el grano, el trigo constituiría una mejor

fueron fuente de carbono y nitrógeno inicial para el hongo cuando se utiliza un sistema de cultivo de agar PDA a grano. Según la caracterización previa realizada a los granos utilizados para este estudio, el grano de trigo posee un mayor contenido tanto de carbono como de nitrógeno (anexo 2).

En un estudio cualitativo de la colonización de diferentes sustratos por *P. ostreatus*, se encontró que el trigo constituye un mejor sustrato para la preparación de *spawn*, seguido de la cebada (Suárez, C., 2010). En otro estudio con este hongo los sustratos con mejor respuesta fueron cebada sin cáscara y sorgo, completando la colonización del sustrato en 9 días (Valenzuela, X., 2008). En dicho estudio los sustratos empleados fueron granos de sorgo, cebada sin cáscara y cebada con cáscara previamente rehidratados y esterilizados. Tomando esto en consideración se puede inferir que la cáscara de la cebada pudo actuar como barrera para el micelio, limitando la colonización del grano, a diferencia de grano de trigo utilizado en éste estudio, el cual no presentaba cáscara. En un tercer estudio (Aldana, A., 2000) también cualitativo, se determinó que el grano de cebada fue el que produjo mayor crecimiento micelial en la producción de inóculo primario; seguido de granos de trigo. En dicho estudio se evaluó la eficiencia de producción de inóculo primario en cinco granos: sorgo, trigo, arroz, maíz y cebada.

2.2 ESTIMACIÓN DE BIOMASA EN INÓCULO SECUNDARIO

El crecimiento de micelio entre la semana dos y cuatro, bajo el sistema de inoculación de grano a grano se expresó en longitud de hifa m/ gramo de grano y está representado en la figura 6. El crecimiento máximo alcanzado por los cultivos en trigo y cebada fue de 1060 m/g y 1289.6 m/g respectivamente.

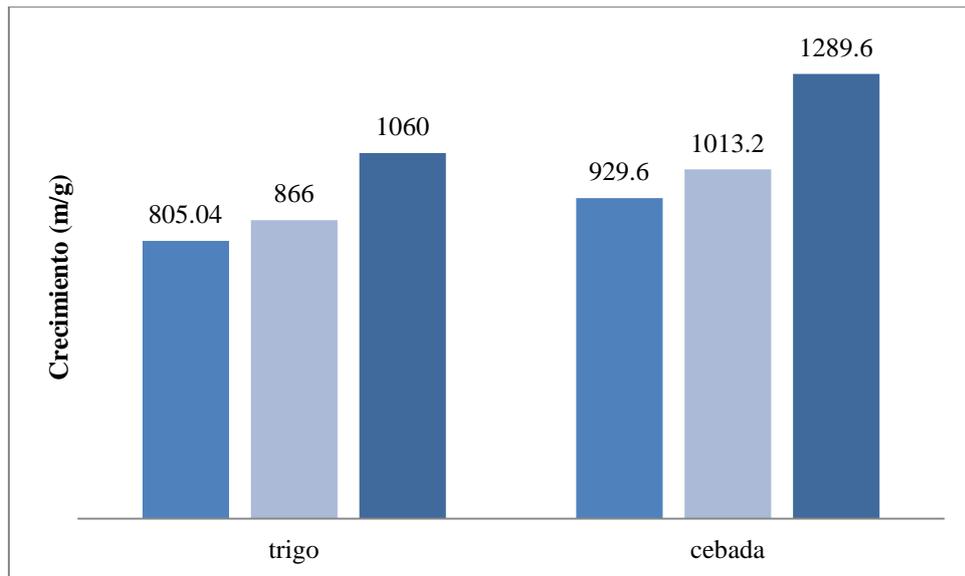


Figura 8. Crecimiento de micelio en cultivos inoculados con micelio propagado en grano. Segunda semana, tercera semana, cuarta semana.

En este sistema de cultivos inoculados con inóculo secundario, se observó un mayor crecimiento del micelio en granos de cebada entre la semana dos y cuatro cultivo; sin embargo, la producción de biomasa del hongo en granos de trigo no difiere de manera significativa con respecto a la producción en granos de cebada durante este periodo de ensayo. Todas las pruebas se realizaron a un nivel de significancia de 0,05 (Tabla 2). Al igual que en los cultivos inoculados con inóculo primario no se evaluó el crecimiento en la primera semana del cultivo debido a que la proliferación del micelio en los granos era aun muy pobre y éste no era detectable al microscopio.

Al comparar la producción de biomasa de inóculos primario y secundario, se determinó que éstos difieren entre sí y que éstas diferencias son significativas en la segunda ($p=0.003$), tercera ($p=0.038$) y cuarta semana ($p=0.010$). En la segunda semana los tratamientos trigo y cebada inoculados con grano presentan un mejor crecimiento en comparación a los tratamientos inoculados con agar PDA. En la tercera semana, los granos de cebada inoculados con grano presentan un mejor crecimiento. Finalmente en la cuarta semana de cultivo, los granos de cebada inoculados con grano y los granos de trigo inoculados con agar PDA presentaron mejor crecimiento en comparación al resto de tratamientos.

Además, en el inóculo secundario la colonización del grano fue más rápida. El micelio alcanzó colonizar $\frac{3}{4}$ de bolsa en dos semanas de cultivo.

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
D14	Inter-grupos	7757596,800	1	7757596,800	,328	,574
	Intra-grupos	4,262E8	18	2,368E7		
	Total	4,340E8	19			
D21	Inter-grupos	1,083E7	1	1,083E7	,455	,508
	Intra-grupos	4,283E8	18	2,379E7		
	Total	4,391E8	19			
D28	Inter-grupos	2,636E7	1	2,636E7	1,101	,308
	Intra-grupos	4,309E8	18	2,394E7		
	Total	4,572E8	19			

Tabla 2: Análisis de Varianza (ANOVA) de la producción de biomasa del inóculo secundario del hongo *P. ostreatus* con granos de trigo y cebada.

Durante el crecimiento de los hongos, la fase de latencia se minimiza, o incluso se suprime si éste es re-inoculado, a partir de una colonia que crece en fase exponencial, a otro medio de características similares (composición, pH, temperatura). Sin embargo, la fase de latencia puede presentarse aún en estas condiciones si el hongo es maltratado durante la siembra. En este caso, el hongo sintetizará pares y preparará puntos de crecimiento (Sánchez-Vásquez, J. & Royse, D., 2001)

Bosiljcic, en el 2008, trabajó en la bioaumentación de sedimentos contaminados con HAP utilizando *P. ostreatus*. En este estudio se utilizó aserrín y papel periódico picado como suplementos. Empleando microscopía de epifluorescencia determinó la biomasa de dicho hongo expresada en metros por gramo de sedimento. Al día 21, se hallaron longitudes máximas de 308 ± 180 m/g de sedimento y al día 42 longitudes de hasta 374 ± 18 m/g de sedimento.

Gacura, en el 2009, utilizando microscopia de fluorescencia, estimó la biomasa de *P. ostreatus* en sedimentos de río usando como suplementos aserrín, dos niveles de nitrógeno y ciclodextrina. A la segunda semana de incubación la biomasa de este hongo alcanzó niveles entre 49.85 ± 12.13 m/g de sedimento, con el tratamiento con aserrín alto contenido de nitrógeno y 114.48 ± 37.58 m/g de sedimento, con el tratamiento con aserrín y ciclo dextrina.

En mediciones de longitud de hifa de *Rhizopus oligosporus* durante la fermentación de tempeh de soya, Feng, X. y colaboradores, en el 2004, reportaron longitudes de hasta 1064.0 ± 348.4 m/g para fermentaciones de 24 horas. Además en cultivos mixtos de *L. fermentum* y *R. oligosporus* presentaron los niveles más bajos en cuanto a longitud de hifa con un valor de 789.8 ± 171.0 m/g.

Desde el punto de vista procedimental, el trabajar con cultivos inoculados a partir de grano o inóculo secundario disminuye las posibilidades de contaminación y su transferencia (de inóculo primario a secundario) es más sencilla y menos delicada que la transferencia de micelio crecido en agar PDA a grano. Por el contrario, el inóculo primario debido a su riqueza nutricional y el mismo procedimiento de inoculación que implica, es más susceptible a la contaminación. Adicionalmente, la propagación del hongo en el inóculo secundario es más rápida en razón de estar ya adaptado al grano; así, se puede inocular mayor cantidad de porciones (Calderón, J. A. 2009, Sánchez, JE., 1993).

La utilización de inóculos secundarios para la siembra en el sustrato definitivo es ampliamente recomendada no solo por las ventajas técnicas que representa sino porque permite una reducción de costos. Se disminuye el consumo de agar y medios sintéticos para la producción de inóculos, así como la necesidad de mantener cultivos de *P. ostreatus* en agar PDA en grandes cantidades, los cuales requieren ser repicados cada cierto tiempo y requieren condiciones de almacenamiento asépticas (Calderón, J. A. 2009).

3. COLONIZACIÓN DEL MICELIO EN SUELO

3.1 COLONIZACION DEL SUELO POR INÓCULO SECUNDARIO DE TRIGO

El crecimiento del micelio en suelo contaminado entre los días 4 y 16 del ensayo se muestra en la figura 7. Se observó incremento en el crecimiento del control y los tratamientos hasta el día ocho, a partir del cual el tratamiento sin suplementos comienza a decaer. Por otro lado, el tratamiento de suelo suplementado con soya y el control continúan su crecimiento hasta el día 12. El tratamiento contaminado con 10 000 ppm de crudo de petróleo sin suplementos y el suplementado con aserrín presentaron mayor crecimiento que el control y el tratamiento suplementado con soya hasta el día 8 sin ser estas diferencias significativas. Hasta ese día el crecimiento máximo alcanzado por el tratamiento sin suplementos fue de 2.20 cm y el alcanzado por el tratamiento con aserrín fue de 2.17 cm. El control sin contaminante se mantuvo mejor en el tiempo que el resto de tratamientos. Hasta el día 16, el control alcanzó un crecimiento de 2.11 cm, el tratamiento sin suplementos alcanzó un crecimiento máximo de 1.82 cm; el tratamiento suplementado con soya, 1.72 cm y el tratamiento suplementado con aserrín, 1.76 cm y no se encontraron diferencias significativas entre estos valores.

Durante la incubación de los tratamientos se observó la presencia de un hongo de micelio blanquecino de características diferentes a *P. ostreatus* en el tratamiento suplementado con torta de soya. Se descartó contaminación en las hojuelas de soya mediante el autoclavado previo de este sustrato. En la repetición del ensayo con hojuelas de torta de soya autoclavadas, el micelio continuó apareciendo en el cultivo, aunque en menor cantidad. El enriquecimiento con nitrógeno proveniente de la torta de soya pudo estimular el crecimiento de hongos nativos del suelo utilizado en este estudio (Gacura, M., 2009). Asimismo, el hongo no identificado pudo competir por los nutrientes del medio con *P. ostreatus*; no obstante, dicho efecto no se consideraría significativo debido a la capacidad de *P. ostreatus* de adaptarse a la presencia de otros microorganismos en el suelo (Hestbjerg et al., 2003).

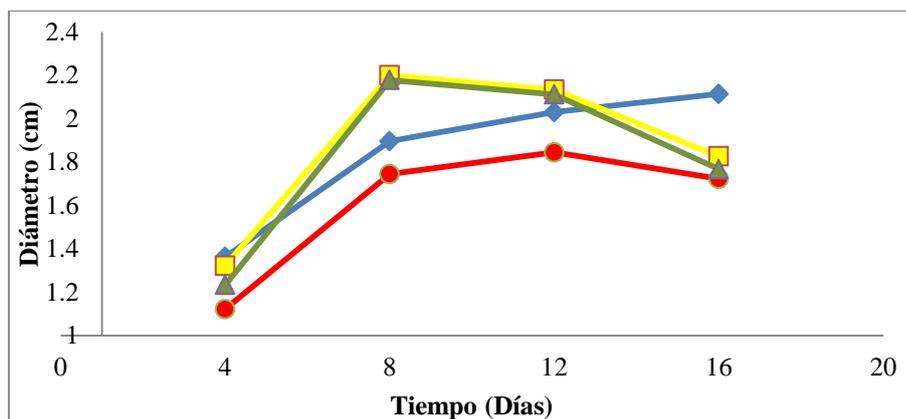


Figura 9. Niveles de colonización de suelo por inóculo de *P. ostreatus* producido con granos de trigo. ◆ C1: Suelo sin contaminar, □ T1: Suelo contaminado, ● T2: Suelo contaminado suplementado con torta de soya, ▲ T3: Suelo contaminado suplementado con aserrín.

3.2 COLONIZACION DEL SUELO POR INÓCULO SECUNDARIO DE CEBADA

El crecimiento del micelio entre los días 4 y 16 del ensayo se muestran en la Figura 9. Se observó un incremento en el crecimiento del control y los tratamientos (excepto el suplementado con soya) hasta el día doce, a partir del cual el comportamiento de éstos se diferencia. Hasta el día 8, el suelo contaminado sin suplementos alcanzó mayor crecimiento, 2.23 cm; mientras que el tratamiento con soya presentó el menor, 1.88 cm; al igual que en el ensayo en suelo inoculado con trigo. Los valores máximos alcanzados por los distintos tratamientos fueron: el control y el tratamiento suplementado con aserrín al día 12 con 2.54 y 2.26 cm respectivamente; y los tratamientos suplementados con aserrín y torta de soya al día 8 con 2.02 y 1.88 cm respectivamente. Hasta el día 16, el control alcanzó un crecimiento de 2.26 cm, el tratamiento sin suplementos alcanzó un crecimiento máximo de 2.03 cm; el tratamiento suplementado con torta de soya, 1.75 cm y el tratamiento suplementado con aserrín, 2.28 cm. Ningún tratamiento alcanzó mayor crecimiento que el control sin contaminante.

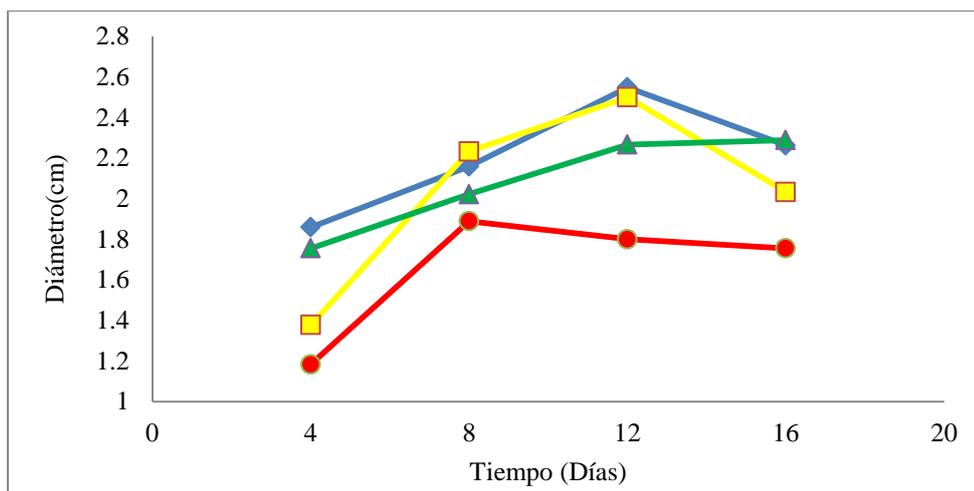


Figura 10. Niveles de colonización de suelo por inóculo de *P. ostreatus* producido con granos de cebada. ◆ C1: Suelo sin contaminar, □ T1: Suelo contaminado, ● T2: Suelo contaminado suplementado con torta de soya, ▲ T3: Suelo contaminado suplementado con aserrín.

Al comparar la colonización del suelo contaminado por los inóculos de trigo y cebada se observó que el crecimiento del micelio en los tratamientos inoculados con cebada fue mayor durante los 16 días de ensayo y que las diferencias entre estos dos grupos de tratamiento fueron significativas en el día 4 y en el día 12 del ensayo. Asimismo, el análisis de varianza mostró que existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos aplicados al suelo (inoculados con trigo y cebada). Sin embargo, la prueba de comparaciones múltiples de Tukey no permitió determinar cual tratamiento fue el mejor debido a las fluctuaciones en el crecimiento del micelio a lo largo del ensayo.

Para comparar el efecto del tiempo se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para días 4, 8, 12 y 16 del ensayo de colonización (Tabla 3). Se observó que existen diferencias estadísticamente significativas entre los días 4 y 8, 4 y 12 y entre 4 y 16, a un nivel de significancia de 0,05. Por lo tanto, el hongo presentó un mayor crecimiento del micelio entre los días 4 y 8, y fue más lento hasta el día 16.

Estudios de colonización de suelo por hongos degradadores de madera parecen indicar que el principal factor que afecta la colonización del suelo por estos hongos es la presencia de organismos nativos. Así, en dichos estudios, el suelo estéril presentó grandes diferencias en la colonización a comparación del suelo no estéril, requiriendo

éste de sustratos adicionales para permitir el crecimiento del hongo (Baldrian P., 2008).

Tiempo	6 días	9 días	12 días
3 días	0,004	0,000	0,004
6 días		0,508	1,000
9 días			0,544

Tabla 3: Prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Significancia estadística entre los niveles del factor tiempo

El hongo no identificado pudo competir por los nutrientes del medio con *P. ostreatus*; por lo que su crecimiento en el suelo suplementado con soya, fue menor en comparación con los demás tratamientos tanto para el grupo con inóculo de trigo como con el inóculo de cebada. No obstante, dicho efecto no se consideraría significativo debido a la capacidad de *P. ostreatus* de adaptarse a la presencia de otros microorganismos en el suelo y considerársele como un competidor fuerte junto con otras especies del género *Pleurotus*, *Phanerochaete* y el hongo *Trametes versicolor* (Hestbjerg et al., 2003; Lang E. et al., 1998).

La disminución en el crecimiento del micelio tanto en los tratamientos con trigo como en los de cebada se pudo deber principalmente a la pérdida de humedad de los sistemas (Sharma, V.P. & Kumar, S., 2011). Asimismo, el micelio pudo detener su crecimiento debido a la falta de una fuente de carbono debido a que el petróleo, al igual que la lignina, no puede ser utilizado como fuente de carbono por el hongo sino que su degradación es consecuencia del metabolismo secundario de éste (Rubilar, O. 2007; Chaparro, D & Rosas, D., 2006). En consecuencia, para garantizar la sobrevivencia del hongo en el suelo, deben ser agregados sustratos lignocelulósicos en una proporción adecuada para mantener la humedad en el sistema así como la proporción de C/N (Adenipekun C. O. & Lawal R., 2012).

Es importante considerar la relación C/N de los sustratos pues altas relaciones favorecen el crecimiento micelial que es la fase con la que se trabaja para fines de biorremediación (Garzón, J., 2008). Los hongos son dependientes de esta relación

para que ocurra un adecuado desarrollo miceliano; así en sustratos con elevada concentración de N, y consecuente baja relación de C/N, no proporcionan una colonización total del sustrato y reprime la degradación de lignina y retarda o hasta llega a cesar el crecimiento del micelio (García, G. 2009). De esta manera, el porcentaje de torta de soya (1%), la fuente de nitrógeno utilizada en este estudio, pudo constituir un limitante del crecimiento de *P. ostreatus* en el suelo contaminado.

Si bien el pH está directamente relacionado con el potencial de crecimiento del hongo y la actividad enzimática de éste (Sánchez et al., 2001), los ensayos no parecen mostrar un efecto negativo significativo en la colonización del suelo pese a su naturaleza ácida (pH 4.74, anexo 1) y a estar fuera del rango de pH óptimo (pH 5.5 – 6.5, Garzón, J. 2008; Martínez, J., 2012). Se pudo evidenciar un patrón de crecimiento constante en los controles con suelo no contaminado, superando a los tratamientos con suelo contaminado para el caso del ensayo de colonización con inóculo de cebada. Ante esta evidencia no se podría asegurar que el pH del suelo en estudio inhibió el crecimiento del hongo en los sistemas probados.

Se podría evaluar en el futuro si alcanzar el pH óptimo para esta especie favorecería significativamente el crecimiento del micelio a lo largo del tiempo. Sin embargo, la falta de nutrientes del sustrato, principalmente una fuente de carbono, así como la pérdida de humedad parecen ser la principal causa de la disminución del crecimiento del micelio más que la variación de pH, pues los hongos son capaces de resistir fluctuaciones bastante amplias en las condiciones ambientales (Singh, H., 2006).

Uno de los aspectos más importantes en el uso de hongos ligninolíticos en biorremediación es la supervivencia de cepas introducidas en un ambiente no natural como el suelo. Muchos estudios demuestran que tanto los factores bióticos como los abióticos influyen en el crecimiento de los hongos en el suelo (Anastasi, A. et al., 2013). Por lo general, mientras mayor sea la biomasa del inóculo, el establecimiento del hongo en el suelo será más rápido y más exitoso (Baldrian, P., 2008). No obstante, existe poca información disponible sobre la supervivencia de los hongos ligninolíticos en suelo, en especial de aquellos que no son de consumo humano (Magan, N. et al., 2010)

V. CONCLUSIONES

1. Se logró producir inóculo del hongo *P. ostreatus* en granos de trigo y cebada, alcanzando una colonización total de dichos sustratos en cuatro semanas de cultivo.
2. En los cultivos inoculados con micelio crecido en agar PDA (inóculo primario), la producción de biomasa fue mayor al utilizar trigo como sustrato (1210.40 m/g) en comparación con la cebada (67 3.08 m/g), siendo estas diferencias significativas en la tercera y cuarta semana.
3. En los cultivos inoculados con grano (inoculo secundario), la producción de biomasa fue mayor al utilizar trigo como sustrato (106 0 m/g) en comparación con la cebada (105 3.60 m/g) sin observarse diferencias significativas a lo largo del ensayo.
4. Se observó diferencias significativas en el diámetro de colonización entre los distintos tratamientos probados en la colonización del suelo, tanto con el inóculo de trigo como el de cebada; sin embargo, no se pudo determinar que tratamiento fue el mejor.
5. Pese a que la producción de biomasa de *P. ostreatus* fue mayor al utilizar trigo para la producción de inóculo primario, los niveles de colonización en suelo contaminado alcanzados por los tratamientos con el inóculo de cebada fueron mayores que los de trigo.
6. Los suplementos (torta de soya y aserrín) adicionados al suelo en el ensayo de colonización, parecen no favorecer al crecimiento del hongo; y la humedad pudo ser un factor limitante del crecimiento micelial de los inóculos secundarios de trigo y cebada en el suelo contaminado.

VI. RECOMENDACIONES

1. Producir inóculo primario usando granos de trigo para obtener mayor biomasa y posteriormente utilizar ésta para inocular granos de cebada para producir inóculo secundario que se utilizará para inocular un sustrato definitivo o suelo contaminado directamente.
2. Optimizar la humedad en los sistemas con suelo contaminado, para prolongar el crecimiento del micelio. Sobre todo cuando se usen suplementos secos como el aserrín debido a que por su naturaleza absorbe humedad.
3. Probar diferentes niveles de contaminación de petróleo crudo en suelo sin ningún suplemento, para probar dosis mínimas y máximas que permitan el crecimiento del hongo. Medir nivel de degradación de petróleo en dichos tratamientos.
4. Probar enriquecer suelo con torta de soya u otra fuente de nitrógeno, sin inocular *P. ostreatus*, para estimular crecimiento de hongos nativos del suelo. Posterior identificación y aislamiento de dichos hongos con potencial biorremediador.
5. Realizar ensayo de colonización de suelo a temperaturas más altas (entre 24° y 40°C), debido a que los lugares de potencial aplicación para biorremediación se encuentran en zonas cálidas como el Norte del Perú y la Región Amazónica.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adenipekun C. O. & Lawal R. 2012. Uses of mushrooms in bioremediation: A review. *Biotechnology and Molecular Biology Review* 7(3):62-68

Aguderlo, L., Macias K. & Suarez J. 2001. Fitorremediación: la alternativa para absorber metales pesados de los biosólidos. *Revista Lasallista*. 2(1):57-60

Alexopoulos, C.J.; Mims, C.W. & Blackwell, M. 1996. *Introductory Mycology*. New York: John Wiley & Sons, Inc. 865p.

Aldana, A. 2000. Comparación de la eficiencia de producción de inóculo primario de hongo comestible *Pleurotus ostreatus* cepa ECS 0110, en cinco granos. Ingeniero Agrónomo. Guatemala. Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala.

Almeida, J., Augusto, F. & Sale, Isabel. 2010. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. *Eclética Química*. 35(3):17-43

Anastasi, A., Tigini, V. & Varese, GC. 2013. The bioremediation potential of different ecophysiological groups of fungi. En: *Fungi as Bioremediators*. Goltapeh, EM, Danesh, YR & Varma, A. (Eds.)

Anderson, E. 2001. Colonization and PAH degradation by wood-rotting fungi in contaminated soil.

Baldrian, P. 2008. White-rot fungi in bioremediation: ecology in the soil environment. 4th European Bioremediation Conference. Chania. Grecia

Baldrian, P., in der Wiesche, C., Gabriel, J., Nerud, F. & Zadrazil, F. 2000. Influence of cadmium and mercury on activities of ligninolytic enzymes and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pleurotus ostreatus* in soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:2471–2478.

Baldrian, Petr. 2008. Wood-inhabiting ligninolytic basidiomycetes in soils: Ecology and constraints for applicability in bioremediation.

Ballaminut, N. & Matheus, D. R.. 2007. Characterization of fungal inoculum used in soil bioremediation. *Brazilian Journal of Microbiology*. 38(2)

Barr, D. P. & Aust, S. D. 1994. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environmental Science and Technology*. 28:79-87.

Base de datos taxonómica de UniProt. Revisado el 15 de agosto del 2012. Disponible en <http://www.uniprot.org/help/taxonomy>

Benavides, J., Quintero, G., Guevara, A., Jaimes, D., Gutiérrez, S., Miranda J. 2006. Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova*. 4(5):82-90

Berger, T. 2005. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos totais de petróleo – enfoque na aplicação do processo de Terrafern®. Doctor. Porto Alegre – Brazil. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Bezalel, L., Hadar, Y. & Cerniglia, C. E. 1996a. Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 62:292–295.

Bezalel, L., Hadar, Y., Fu, P. P., Freeman, J. P. & Cerniglia, C. E. 1996b. Metabolism of phenanthrene by the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 2547–2553.

Boddy L., Frankland, J.C. & West, P. Van. 2008. Ecology of Saprotrophic Basidiomycetes. Edit. 1ª Edición. The British Mycological Society. Academic Press. Reino Unido.

Bogan, B.W. & Lamar, R.T. 1996. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Capabilities of *Phanerochaete laevis* HHB-1625 and Its Extracellular Ligninolytic Enzymes. *Applied and Environmental Microbiology*. 62(5): 1597–1603

Boyd-Wilson, K & Walter M. 2002. White-rot fungi to degrade pentachlorophenol: Development of a biotechnology tool using New Zealand. Waste Management Institute New Zealand 14th Annual Conference November.

Bosiljic, GR, Gacura, MD & Johnston, CG. 2008. Colonization and Remediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Contaminated River Sediment using *Pleurotus ostreatus*. ASM Ann Meet, Boston, MA

Calderón, J. A. 2009. Determinación de la mejor etapa de aplicación de la fertilización nitrogenada en el sustrato caña de maíz (*zea mays* L.) para la producción del hongo *Pleurotus ostreatus* (jacq.) Kumm (cepa ecs-152). Ingeniero agrónomo en sistemas de producción agrícola. Guatemala. Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala.

Chaparro, D & Rosas, D. 2006. Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática de hongos descomponedores de madera en la reserva natural La Montaña del Ocaso, Quimbaya – Quindío. Microbióloga Industrial. Bogotá Colombia. Pontificia Universidad Javeriana.

Cisterna, C. 2003. Clasificación ecofisiológica de los hongos comestibles. Micotec Ltda. Chile. Disponible en <http://www.micotec.cl/articulos.html>

Cohen, R., Persky, L. & Hadar, Y. 2002. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 58(5): 582-594.

Comisión chilena del cobre COCHILCO. 2001. Biolixiviación: desarrollo actual y sus expectativas. Dirección de estudios y políticas públicas.

Da Silva, RR. 2009. Biorremediação de solos contaminados com organoclorados por fungos basidiomicetos em biorreatores. Doctor. São Paulo, Brasil. Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente. 186 p.

Darcy Young, MA. 2012. Bioremediation with White-Rot Fungi at Fisherville Mill: Analyses of Gene Expression and Number 6 Fuel Oil Degradation. Mosakowski Institute for Public Enterprise. Paper 12. Clark Digital Commons.

Déley, A. 2010. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo del campamento Sacha 161 utilizando el hongo *P. ostreatus*. Ingeniero en Biotecnología Ambiental. Riobamba, Ecuador. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. 111p.

Demnerová, K., Mackova, M., Speváková, V., Beranova, K., Kochánková, L., Lovecká, P., Ryslavá, E. & Macek, T. 2005. Two approaches to biological decontamination of groundwater and soil polluted by aromatics—characterization of microbial populations. *International Microbiology*. 8:205-211

Dias, S., Solórzano, J., Afonso, C. & Gomes, S. 2008. Emprego de Fungos Filamentosos na Biorremediação de Solos Contaminados por Petróleo: Estado da Arte. *Série Tecnologia Ambiental*, 45. CETEM/MCT. Rio de Janeiro. 67p.

Di Paloma, M. & Vicién, C. 2010. Biorremediación: vinculaciones entre investigación, desarrollo y legislación. Documento de trabajo. CONICET. Buenos Aires. Argentina.

Floriani, F. 2009. Biodegradação de 2,4-diclorofenol e 2,4,6-triclorofenol por fungos do gênero *Pleurotus*. *Maestro en Ingenieria Procesos*. Joinville. Brasil. Univille.

Gacura, M. 2009. Effect of *Pleurotus ostreatus* on Bioremediation of PAH Contaminated River Sediment. Master of Science – Biological Science Program. United States. Youngstown State University.

Gadd, G. M. 2001. *Fungi in Bioremediation*. Cambridge University Press. Estados Unidos. 472p.

Gaitán-Hernandez, R., Salmones, D., Perez, R. & Mata, G. 2006. Manual práctico del cultivo de setas: aislamiento, siembra y producción. 1era. ed. Instituto de Ecología A.C. Xalapa. México. 56 p.

García, G. 2009. Influência do substrato no cultivo e na composição química do cogumelo *Pleurotus florida*. *Maestro en Agronomía*. Ilha Solteira. São Paulo. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mezquita Filho”

Garzón, J. & Cuervo, J. 2008. Producción de *Pleurotus ostreatus* sobre residuos sólidos lignocelulósicos de diferente procedencia. NOVA – Publicación científica en ciencias biomédicas. 6(1):101-236

Gao, D., Du, L., Yang, J., Wu, WM., & Liang, H. 2010. A critical review of the application of white rot fungus to environmental pollution control. Critical Reviews in Biotechnology. 30(1): 70–77

Gomes, K. & Roberto, D. 2006. Biodegradation of Remazol Brilliant Blue R by ligninolytic enzymatic complex produced by *Pleurotus ostreatus*. Brazilian Journal of Microbiology 37:468-473

Gresham, T. SF. Brief introduction to water and soil pollution. En línea. National Geographic. Consultado 3 Mayo 2012. Disponible en <http://greenliving.nationalgeographic.com/brief-introduction-water-soil-pollution-2137.html>

Hammel, KE. 1995. Mechanisms for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation by Ligninolytic Fungi. Environmental Health Perspectives. 103(5):41-43

Hatakka, A. 1990. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. FEMS Microbiology Reviews. 13:125–135.

Hestbjerg H, Willumsen PA, Christensen M, Andersen O, Jacobsen CS. 2003. Bioaugmentation of tar-contaminated soils under field conditions using *Pleurotus ostreatus* refuse from commercial mushroom production. Environmental Toxicology and Chemistry. 22: 692–698.

Hestbjerg H., Arentsen P., Christensen, M., Andersen, O. & Jacobsen, C.S. 2002. Field scale bioremediation of tar contaminated soil with commercial mushroom *Pleurotus ostreatus* refuse. Oil and hydrocarbon spills III. WIT Press. Southampton. UK

Hirano, T., Honda, Y., Watanabe, T. & Kuwahara, M. 2000. Degradation of Bisphenol A by Lignin-Degrading Enzyme, Manganese peroxidase, produced by White-rot basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 64(9):1958-1962

Jeffries, TW. 1990. Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. *Biodegradation*. 1:163-176

Johnston, C. 2011. Degradación de hidrocarburos de petróleo por hongos de pudrición blanca. Lima. Youngstown University. Comunicación personal.

Juscamaita, J. 2011. Medición de diámetro de colonia de *P. cryosporium* en suelo. Lima. Universidad Nacional Agraria La Molina. Comunicación personal

Kosaric, N. 2001. Biosurfactants for Soil Bioremediation. *Food Technology and Biotechnology* 39(4): 295–304

Kurtzman, R. 2005. Oyster Mushroom cultivation (en línea). Consultado 13 de Mayo del 2013. Disponible en: <http://www.oystermushrooms.net/front.htm>

López-Martínez, S., Gallegos-Martínez, M. & Pérez, L. & Gutiérrez, M. 2005. Mecanismos de fitorremediación de suelos contaminados con moléculas orgánicas xenobióticas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 21(2):91-100

Magan, N., Fragoeiro, S. & Bastos, C. 2010. *Mycobiology* 38(4):238-248

Marquez-Rocha, F., Hernandez-Rodriguez, V. & Vásquez- Duhalt, R. 2000. Biodegradation of soil-adsorbed polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Biotechnology Letters* 22:469-472

Martin Moreno, C., Gonzáles Becerra, A. & Blanco Santos, MJ. 2004. Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. *Revista Iberoamericana de Micología*. 21: 103-120

Menna, M., Murcia1, G., Corleto B., Dinamarca, A., Branda, J. & Garin, E. 2011. Evaluación energética de la biodigestión anaerobia de estiércol de cerdo en condiciones de mínimo manejo. *Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente*. 15: 113-118

Moro, S. 2006 Imobilização de lacase e seu uso na biotransformação de efluentes de indústrias papeleras. Maestro em Biotecnologia. Florianópolis. Brasil. Universidade de Santa Catarina.

Nápoles, J. & Ábalos, A. SF. Biorremediación de ecosistemas contaminados con xenobióticos. Centro de estudios de biotecnología industrial. Universidad de Oriente. Santiago de Cuba.

Novotny, C., Svobodova, K., Erbanova P., Cajthaml, T., Kasinath, A., Lang, E. & Sasek, V. 2004. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. *Soil Biology & Biochemistry* 36:1545–1551

Okparanma, R., Josiah, N., Ayotamuno, M., Davis, D. & Allagoa M. 2011. Mycoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)-contaminated oil-based drill-cuttings. *African Journal of Biotechnology* 10(26):5149-5146

Pascucci, S. 2011. Soil Contamination. InTech. 168 p

Paszczynski, A. & Crawford, R. C. 2000. Recent advances in the use of fungi in environmental remediation and biotechnology. *Soil Biochemistry*. 10: 379–422.

Papinutti, V. L., Luis Alberto Diorio & Flavia Forchiassin. 2003. Degradación de madera de álamo por *Fomes sclerodermeus*: producción de enzimas ligninolíticas en aserrín de álamo y cedro. *Revista Iberoamericana de Micología*. 20: 16-20

Pointing, S. B. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 57(1-2), 20-33.

Quintero, J.C., Feijoo, G. & Lema, J. 2006. Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos. *Vitae*. 13(2):61-67.

Quintero, JC. 2011. Degradación de plaguicidas mediante hongos de la pudrición blanca de la madera. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*. 64(1)

Rubilar, H. 2007. Biorremediación de suelos contaminados con pentaclorofenol (PCF) por hongos de pudrición blanca. Doctor en Ciencias de Recursos Naturales. Temuco. Chile. Universidad de La Frontera

Sanchez-Vásquez, J. & Royse, D. 2001. Biología y cultivo de *Pleurotus spp.* 1ª ed. Uteha-Ecosur, México. 290 p.

Sanchez-Vásquez, J. 1993. Producción de hongos comestibles. Centro de Investigaciones Ecológicas del Sureste. San Cristóbal de las Casas. México. 90 p.

Seiti W. 2010. Optimização da produção de inóculo fúngico de *Psilocybe castanella* CCB444 para bioremediação de solos. Maestro em Biotecnologia. São Paulo. Brazil. Universidade de São Paulo.

Sharma, V.P. & Kumar, S. 2011. Spawn Production Technology. En: Mushrooms Cultivation, Marketing and Consumption. Directorate of Mushroom Research (ICAR), India. 246 p.

Singh, H. 2006. Mycoremediation: Fungal Biorremediation. Estados Unidos. Wiley Interscience. 592 p.

Soares, I., Flores, A., Mendonça, M., Barcelos, R. & Baroni, S. 2011. Fungos na biorremediação de áreas degradadas. Arquivos do Instituto Biológico. 78(2):341-350

Sobal, M., P. Morales, M. Bonilla, G. Huerta & D. Martínez-Carrera. 2007. El Centro de Recursos Genéticos de Hongos Comestibles (CREGENHC) del Colegio de Postgraduados. Capítulo 2.1, 14 pp. En: El Cultivo de Setas *Pleurotus spp.* en México. ECOSUR-CONACYT, México, D.F.

Solanas, AM. 2007. La biodegradación de hidrocarburos y su aplicación en la biorremediación de suelos. Estudios en la zona no saturada del suelo. Vol IX. Barcelona. España.

Stamets, P. & Chilton, J. S. 1983. *The Mushroom Cultivator*. Agarikon Press. Washington. USA. 415p.

Stamets, P. 1993. *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*. Ten Speed Press. Berkeley. USA. 554 p.

Stamets, P. 2005. *Mycelium Running: how mushrooms can help save the world*. Ten Speed Press. Berkeley. USA. 343 p.

Suárez, C. 2010. Obtención in vitro de micelio de hongos comestibles, Shiitake (*Lentinula edodes*) y Orellanas (*Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus Pulmonarius*) a partir de aislamientos de cuerpos fructíferos, para la producción de semilla. Especialista en Ciencias y Tecnología de alimentos. Bogotá. Colombia. Universidad Nacional de Colombia.

United States Environmental Protection Agency. 2001a. *A Citizen's Guide to Bioremediation*. Office of Solid Waste and Emergency Response.

United States Environmental Protection Agency. 2001b. *Treatment Technologies for site cleanup: Annual Status Report. Tenth Edition*. Office of Solid Waste and Emergency Response. 38p

Valenzuela, X. 2008. Evaluación del crecimiento miceliar de hongos comestibles (*Agaricus blazei*, *Lentinula edodes*, *Pleurotus sp*) en tres cereales como sustrato. Ingeniero Agrónomo. La Paz. Bolivia. Universidad Mayor de San Andrés.

Volke, T. & Velasco, J.A. 2002. *Tecnologías de remediación para suelos contaminados*. Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT). México D.F. México. 64 pp.

VIII. ANEXOS

Anexo 1. ANÁLISIS DE SUELO: CARACTERIZACIÓN



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
 FACULTAD DE AGRONOMIA - DEPARTAMENTO DE SUELOS
 LABORATORIO DE ANÁLISIS DE SUELOS, PLANTAS, AGUAS Y FERTILIZANTES
ANÁLISIS DE SUELOS : CARACTERIZACIÓN



Solicitante : DEMETRIO ANGELO LAMA ISMINIO

Departamento : HUANUCO Provincia : TINGO MARIA
 Distrito : TINGO MARIA Predio :
 Referencia : H.R. 22401-019C-09 Bolt.: 5782 Fecha : 13-04-09

Número de Muestra		pH (1:1)	C.E. (1:1) dS/m	CaCO ₃ %	M.O. %	P ppm	K ppm	Análisis Mecánico			Clase Textural	CIC	Cambiables					Suma de Cationes	Suma de Bases	% Sat. De Bases
Lab	Campo							Arena %	Limo %	Arcilla %			Ca ²⁺	Mg ²⁺	K ⁺	Na ⁺	Al ³⁺ + H ⁺			
2815	Fundo Campo Azul	4.74	0.02	0.00	2.8	51.0	133	32	44	24	Fr.	15.68	2.19	0.58	0.33	0.26	5.30	8.66	3.36	21

A = arena ; A.Fr. = arena franca ; Fr.A. = franco arenoso ; Fr. = Franco ; Fr.L. = franco Limoso ; L = limoso ; Fr.Ar.A. = franco arcillo arenoso ; Fr.Ar. = franco arcilloso ;
 Fr.Ar.L. = Franco arcillo limoso ; Ar.A. = Arcillo Arenoso ; Ar.L. = arcillo limoso ; Ar. = Arcilloso


 Ing. Braulio La Torre Martínez
 Jefe del Laboratorio

Amexo 2. INFORME DE ANÁLISIS ESPECIAL EN FOLIAR



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE AGRONOMIA
LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELOS, PLANTAS, AGUAS Y FERTILIZANTES



INFORME DE ANALISIS ESPECIAL EN FOLIAR

SOLICITANTE : ENITH SIFUENTES VASQUEZ
PROCEDENCIA : LIMA
MUESTRA : CEBADA
REFERENCIA : H.R. 40084
BOLETA : 9869
FECHA : 03/05/13

Nº LAB	CLAVES	N %	C %
2616		1.21	56.44



Ing. Braulio La Torre Martínez
Jefe de Laboratorio

Av. La Molina s/n Campus UNALM
Telf.: 614-7800 Anexo 222 Telefax: 349-5622
e-mail: labsuelo@lamolina.edu.pe



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
FACULTAD DE AGRONOMIA
LABORATORIO DE ANALISIS DE SUELOS, PLANTAS, AGUAS Y FERTILIZANTES



INFORME DE ANALISIS ESPECIAL EN FOLIAR

SOLICITANTE : ENITH SIFUENTES VASQUEZ
PROCEDENCIA : LIMA
MUESTRA : TRIGO
REFERENCIA : H.R. 40083
BOLETA : 9869
FECHA : 03/05/13

Nº LAB	CLAVES	N %	C %
2615		1.85	56.83



Ing. Braulio La Torre Martínez
Jefe de Laboratorio

Av. La Molina s/n Campus UNALM
Telf.: 614-7800 Anexo 222 Telefax: 349-5622
e-mail: labsuelo@lamolina.edu.pe

Anexo 3. IMÁGENES ENSAYO COLONIZACIÓN DE SUELO



(a)



(b)

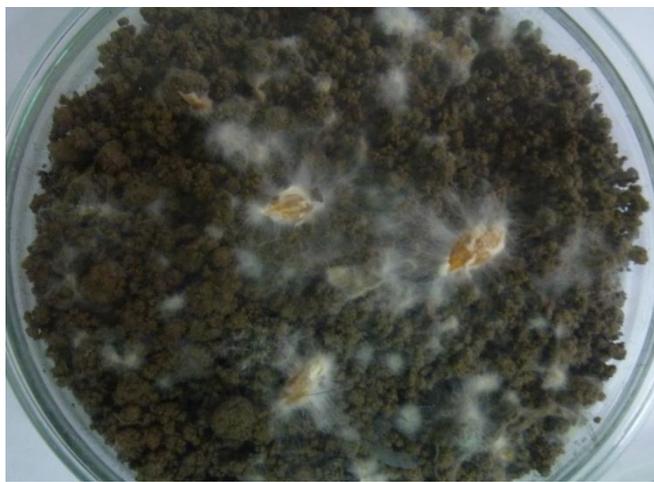


(c)

Colonización del suelo por inóculo de trigo – Día 8. (a) Suelo contaminado sin suplemento, (b) suelo contaminado suplementado con torta de soya, (c) suelo contaminado suplementado con aserrín.



(a)



(b)



(c)

Colonización del suelo por inóculo de trigo – Día 8. (a) Suelo contaminado sin suplemento, (b) su lo contaminado suplementado con torta de soya, (c) suelo contaminado suplementado con aserrín

ANOVA unidireccional: D21 vs. TRATAMIENTO

Fuente	GL	SC	MC	F	P
TRATAMIENTO	1	112527680	112527680	9.60	0.006
Error	18	211097600	11727644		
Total	19	323625280			

S = 3425 R-cuad. = 34.77% R-cuad. (ajustado) = 31.15%

Nivel	N	Media	Desv.Est.	ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada
Cebada	10	4944	2449	(-----*-----)
Trigo	10	9688	4178	(-----*-----)

-----+-----+-----+-----+-----+
5000 7500 10000 12500

Desv.Est. agrupada = 3425

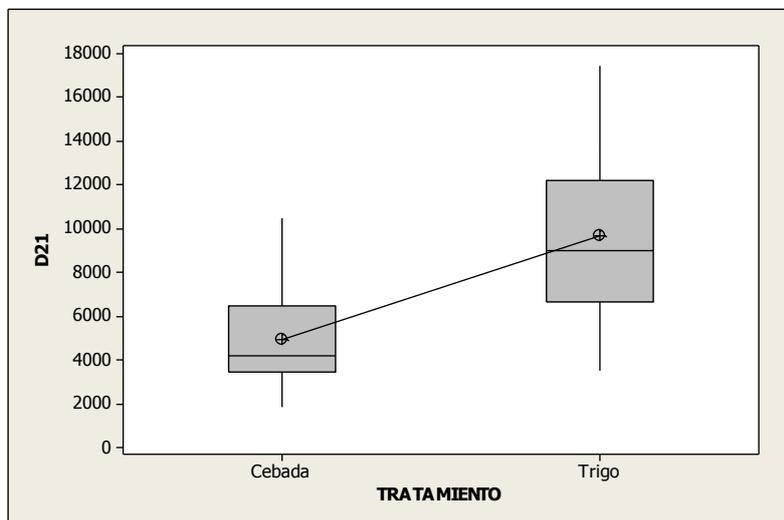
Agrupar información utilizando el método de Tukey

TRATAMIENTO	N	Media	Agrupación
Trigo	10	9688	A
Cebada	10	4944	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de TRATAMIENTO

Nivel de confianza individual = 95.00%



ANOVA unidireccional: D28 vs. TRATAMIENTO

Fuente	GL	SC	MC	F	P
TRATAMIENTO	1	144356391	144356391	13.55	0.002
Error	18	191820418	10656690		
Total	19	336176809			

S = 3264 R-cuad. = 42.94% R-cuad. (ajustado) = 39.77%

ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada

Nivel	N	Media	Desv.Est.
Cebada	10	6731	4107
Trigo	10	12104	2108

-----+-----+-----+-----+-----
 (------*-----)
 (-----*-----)
 -----+-----+-----+-----+-----
 5000 7500 10000 12500

Desv.Est. agrupada = 3264

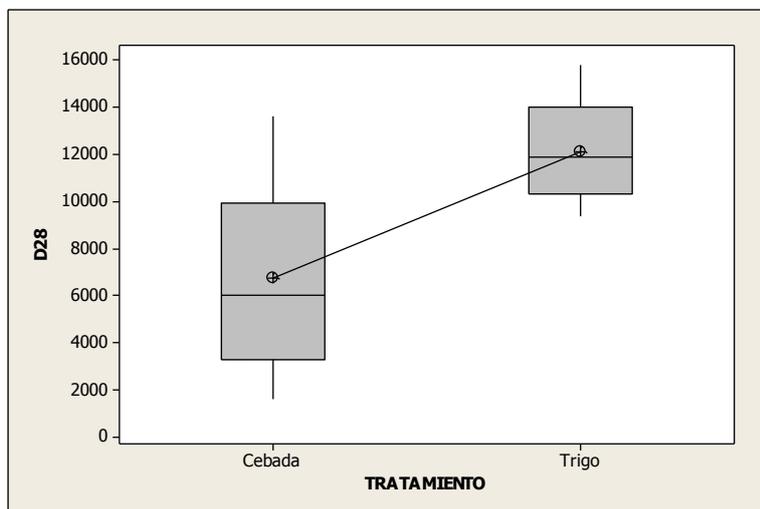
Agrupar información utilizando el método de Tukey

TRATAMIENTO	N	Media	Agrupación
Trigo	10	12104	A
Cebada	10	6731	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de TRATAMIENTO

Nivel de confianza individual = 95.00%



INCULACIÓN GRANO A GRANO

ANOVA unidireccional: D14 vs. Tratamiento

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Tratamiento	1	7757597	7757597	0.33	0.574
Error	18	426214374	23678576		
Total	19	433971971			

S = 4866 R-cuad. = 1.79% R-cuad.(ajustado) = 0.00%

Nivel	N	Media	Desv.Est.	ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada
CebadaC	10	9296	4451	(-----*-----)
TrigoT	10	8050	5249	(-----*-----)

6000 8000 10000 12000

Desv.Est. agrupada = 4866

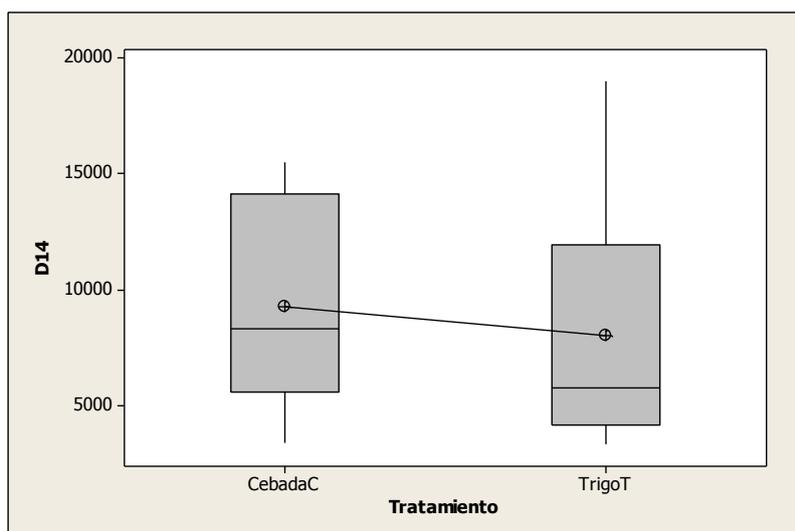
Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tratamiento	N	Media	Agrupación
CebadaC	10	9296	A
TrigoT	10	8050	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
 Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Tratamiento

Nivel de confianza individual = 95.00%



ANOVA unidireccional: D21 vs. Tratamiento

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Tratamiento	1	10833920	10833920	0.46	0.508
Error	18	428298560	23794364		
Total	19	439132480			

S = 4878 R-cuad. = 2.47% R-cuad. (ajustado) = 0.00%

Nivel	N	Media	Desv.Est.	ICs de 95% individuales para la media basados en Desv.Est. agrupada
CebadaC	10	10132	5440	-----+-----+-----+-----+----- (-----*-----)
TrigoT	10	8660	4242	(-----*-----) -----+-----+-----+-----+-----
				6000 8000 10000 12000

Desv.Est. agrupada = 4878

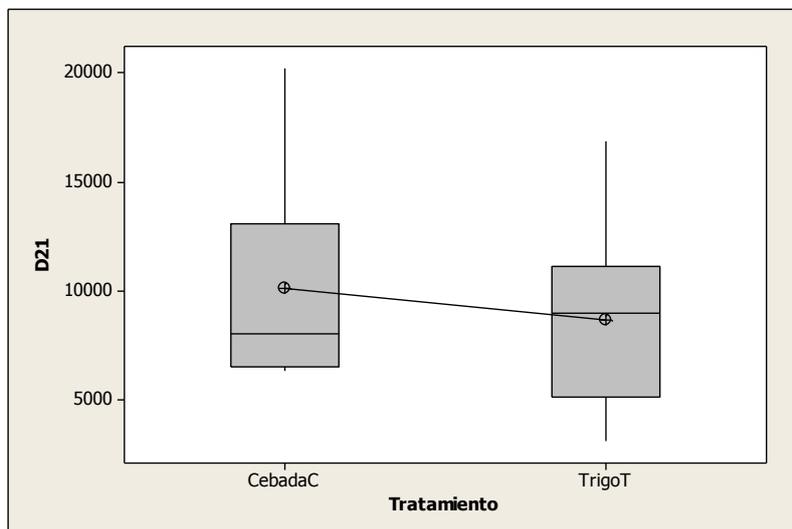
Agrupar información utilizando el método de Tukey

Tratamiento	N	Media	Agrupación
CebadaC	10	10132	A
TrigoT	10	8660	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Intervalos de confianza simultáneos de Tukey del 95%
Todas las comparaciones de dos a dos entre los niveles de Tratamiento

Nivel de confianza individual = 95.00%



ANOVA de un factor para Ensayo de Biomasa

ANOVA

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
D14	Inter-grupos	2,275E8	3	7,585E7	5,519	,003
	Intra-grupos	4,947E8	36	1,374E7		
	Total	7,223E8	39			
D21	Inter-grupos	1,666E8	3	5,554E7	3,127	,038
	Intra-grupos	6,394E8	36	1,776E7		
	Total	8,060E8	39			
D28	Inter-grupos	2,250E8	3	7,501E7	4,337	,010
	Intra-grupos	6,227E8	36	1,730E7		
	Total	8,477E8	39			

2. ENSAYO VELOCIDAD DE COLONIZACIÓN

ANOVA de dos factores: D4. Especie vs. Sustrato

Class Level Information		
Class	Levels	Values
especie	2	Cebada Trigo
sustrato	4	Aserrin Control Petroleo Soya

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
especie	1	0.48327337	0.48327337	7.12	0.0168
sustrato	3	0.70250735	0.23416912	3.45	0.0418
especie*sustrato	3	0.30555246	0.10185082	1.50	0.2525

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for D4

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	16
Error Mean Square	0.067892
Critical Value of Studentized Range	2.99800
Minimum Significant Difference	0.2255

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	especie
A	1.5440	12	Cebada
B	1.2602	12	Trigo

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for D4

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	16
Error Mean Square	0.067892
Critical Value of Studentized Range	4.04609
Minimum Significant Difference	0.4304

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	sustrato
A	1.6111	6	Control
B A	1.4944	6	Aserrin
B A	1.3500	6	Petroleo
B	1.1528	6	Soya

ANOVA de dos factores: D8. Especie vs. Sustrato

Class Level Information		
Class	Levels	Values
especie	2	Cebada Trigo
sustrato	4	Aserrin Control Petroleo Soya

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
especie	1	0.03050692	0.03050692	0.33	0.5746
sustrato	3	0.50902900	0.16967633	1.83	0.1829
especie*sustrato	3	0.14250569	0.04750190	0.51	0.6801

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for D8

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	16
Error Mean Square	0.092893
Critical Value of Studentized Range	2.99800
Minimum Significant Difference	0.2638

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	especie
A	2.0759	12	Cebada
A	2.0046	12	Trigo

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for D8

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	16
Error Mean Square	0.092893
Critical Value of Studentized Range	4.04609
Minimum Significant Difference	0.5034

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	sustrato
A	2.2167	6	Petroleo
A	2.1000	6	Aserrin
A	2.0278	6	Control
A	1.8167	6	Soya

ANOVA de dos factores: D12. Especie vs. Sustrato

Class Level Information

Class	Levels	Values
especie	2	Cebada Trigo
sustrato	4	Aserrin Control Petroleo Soya

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
especie	1	0.66298310	0.66298310	14.58	0.0015
sustrato	3	0.73564682	0.24521561	5.39	0.0093
especie*sustrato	3	0.51459122	0.17153041	3.77	0.0319

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for D12

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	16
Error Mean Square	0.045458
Critical Value of Studentized Range	2.99800
Minimum Significant Difference	0.1845

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	especie
A	2.27870	12	Cebada
B	1.94629	12	Trigo

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for D12

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	16
Error Mean Square	0.045458
Critical Value of Studentized Range	4.04609
Minimum Significant Difference	0.3522

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	sustrato
A	2.2889	6	Control
A	2.1889	6	Aserrin
B	2.1500	6	Petroleo
B	1.8222	6	Soya

ANOVA de dos factores: D16. Especie vs. Sustrato

The ANOVA Procedure

Class Level Information

Class	Levels	Values
especie	2	Cebada Trigo
sustrato	4	Aserrin Control Petroleo Soya

Source	DF	Anova SS	Mean Square	F Value	Pr > F
especie	1	0.88718223	0.88718223	5.56	0.0314
sustrato	3	1.23162481	0.41054160	2.57	0.0903
especie*sustrato	3	0.59863120	0.19954373	1.25	0.3244

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for D16

NOTE: This test controls the Type I experimentwise error rate, but it generally has a higher Type II error rate than REGWQ.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	16
Error Mean Square	0.159538
Critical Value of Studentized Range	2.99800
Minimum Significant Difference	0.3457

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	especie
A	2.0851	12	Cebada
B	1.7006	12	Trigo

Tukey's Studentized Range (HSD) Test for D16

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	16
Error Mean Square	0.159538
Critical Value of Studentized Range	4.04609
Minimum Significant Difference	0.6598

Means with the same letter are not significantly different.

Tukey Grouping	Mean	N	sustrato
A	2.1880	6	Control
A	2.0278	6	Aserrin
A	1.7389	6	Soya
A	1.6167	6	Petroleo