



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

“EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DEL HONGO *Pleurotus ostreatus* EN LA BIODEGRADACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON CLORPIRIFOS”

Trabajo de titulación

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar el grado académico de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORA: JESSICA ADRIANA MINTA CARRILLO

DIRECTOR: Dr. EDGAR IVÁN RAMOS SEVILLA

Riobamba – Ecuador

2020

© 2020, Jessica Adriana Minta Carrillo

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, Jessica Adriana Minta Carrillo, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos presentes en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación. El patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica del Chimborazo

Riobamba, 23 de noviembre de 2020



Jessica Adriana Minta Carrillo

220031578-2

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El Trabajo de Investigación: Tipo: Proyecto de Investigación ,“**EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DEL HONGO *Pleurotus ostreatus* EN LA BIODEGRADACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON CLORPIRIFOS**”, realizado por la señorita : **JESSICA ADRIANA MINTA CARRILLO** , ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Trabajo de Titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

FIRMA

FECHA

Dr. Fausto Manolo Yaulema Garcés
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

**FAUSTO
MANOLO
YAULEMA
GARCES**
Firmado digitalmente por
FAUSTO MANOLO
YAULEMA GARCES
Fecha: 2021.01.15
16:35:33 -05'00'

2020-11-23

Dr. Edgar Iván Ramos Sevilla
**DIRECTOR DE TRABAJO DE
TITULACIÓN**

**EDGAR IVAN
RAMOS SEVILLA**
Firmado digitalmente por EDGAR IVAN RAMOS SEVILLA
Nombre de reconocimiento (DN): cn=EDGAR IVAN RAMOS SEVILLA, serialNumber=0601497233, o=AUTORIDAD DE CERTIFICACION ESPOCH DTIC, c=ESPOCH DTIC, l=RIOBAMBA, c=EC
Fecha: 2021.01.15 16:34:59 -05'00'

2020-11-23

Ing. Cristina Gabriela Calderón Tapia
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

 Firmado electrónicamente por:
**CRISTINA
GABRIELA
CALDERON TAPIA**

2020-11-23

DEDICATORIA

Este trabajo dedico a Dios por haberme dado la fe y la fuerza para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados, a un angelito que está en el cielo Avril Elizabeth porque aún sin haberle conocido se robó mi corazón brindándome mis mejores momentos, a mis padres Venancio y Rosa, que con su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años me apoyaron infinitamente, como también a mi esposo Víctor quien estuvo en todo momento incentivándome a formarme como profesional y como persona , a mis hermanas y hermanos: María, Alexandra, Luis, y Rodrigo quienes siempre estuvieron presentes con sus consejos . A mis dos canes Mylo y July que son parte de mi vida que con su compañía me regalaron paz y alegría en estos años de carrera.

Jessica

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi gratitud a Dios, quien con su bendición llena mi vida y me brindó consuelo y fortaleza a culminar mis estudios.

Mi profundo agradecimiento a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, a la facultad de Ciencias Químicas por darme la oportunidad de obtener un título profesional para ser un verdadero aporte a la sociedad.

A mis profesores en especial al Dr. Iván Ramos, Ing. Cristina Calderón, gracias a cada uno de ustedes por su paciencia, dedicación, apoyo y amistad.

Jessica

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiv
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	
1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	
<i>1.1. El suelo</i>	6
<i>1.1.1. Importancia del suelo en el ambiente</i>	7
<i>1.2. Contaminación del suelo</i>	8
<i>1.2.1. Tipos de contaminantes del suelo</i>	9
<i>1.3. Los Plaguicidas</i>	9
<i>1.3.1. Características de los plaguicidas</i>	10
<i>1.3.2. Contaminación del suelo por clorpirifos (Plaguicida Organofosforado)</i>	11
<i>1.4. Biorremediación</i>	13
<i>1.4.1. Métodos de biorremediación</i>	14
<i>1.5. Micorremediación</i>	16
<i>1.5.1. Hongos saprófitos</i>	17
<i>1.5.2. Grupos de hongos saprófitos</i>	17

<i>1.6. Aplicación de hongos filamentosos para biorremediación</i>	18
<i>1.6.1. Hongos de pudrición blanca</i>	18
<i>1.6.2. Ventajas del uso de los hongos de pudrición blanca</i>	19
<i>1.7. Pleurotus ostreatus – Hongo Ostra</i>	20
<i>1.7.1. Taxonomía</i>	20
<i>1.7.2. Consideraciones para el cultivo de Pleurotus ostreatus</i>	21
<i>1.7.3. Aplicación de Pleurotus ostreatus en métodos de biorremediación</i>	22

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

<i>2.1. Zona de estudio</i>	24
<i>2.1.1. Lugar de la investigación</i>	24
<i>2.2. Tipo de investigación</i>	24
<i>2.2.1. Identificación de variables e Hipótesis</i>	25
<i>2.2.2. Diseño Experimental</i>	25
<i>2.2.3. Esquema del proceso</i>	26
<i>2.2.4. Marco metodológico</i>	28

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

<i>3.1. Tabulación y análisis de las encuestas realizadas a agricultores de la comunidad Sagrado Corazón de Jesús para la selección del sitio de muestreo</i>	37
<i>3.2. Obtención de micelio de Pleurotus ostreatus</i>	39
<i>3.3. Evaluación de inhibición de Pleurotus ostreatus a diferentes concentraciones de clorpirifos</i>	40
<i>3.4. Cultivo de Pleurotus ostreatus en semillas de trigo y cebada</i>	42
<i>3.5. Fructificación de Pleurotus ostreatus en suelo contaminado con clorpirifos</i>	43
<i>3.5.1. Crecimiento durante la primera etapa de fructificación</i>	43
<i>3.5.2. Crecimiento durante la segunda etapa de fructificación</i>	44
<i>3.6. Evaluación de la eficiencia de Pleurotus ostreatus en la degradación de clorpirifos</i>	47
<i>3.7. Análisis estadístico</i>	50
CONCLUSIONES	52
RECOMENDACIONES	53

GLOSARIO

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1.	Funciones ecológicas del suelo.....	7
Tabla 2-1.	Tipos de plaguicidas y sus efectos.....	10
Tabla 3-1.	Características de los clorpirifos.....	11
Tabla 4-1.	Parámetros por considerarse para el cultivo de <i>Pleurotus ostreatus</i>	21
Tabla 1-2.	Diseño Experimental.....	26
Tabla 1-3.	Concentración final de clorpirifos en cada tratamiento.....	47
Tabla 2-3.	Porcentaje de degradación de clorpirifos en cada tratamiento.....	48
Tabla 3-3.	Análisis de varianza de los porcentajes de degradación de clorpirifos.....	51
Tabla 4-3.	Prueba de Tukey para el porcentaje de degradación de clorpirifos.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1.	Estructura de los clorpirifos.....	13
Figura 1-2.	Elaboración de encuestas a los agricultores de la comunidad Sagrado Corazón.	28
Figura 2-2.	Toma de muestras de suelo en el cultivo de tomate bajo invernadero.....	29
Figura 3-2.	Preparación de medio de cultivo (PDA) para la siembra de <i>P. ostreatus</i>	30
Figura 4-2.	Incubación de <i>P. ostreatus</i> en medio PDA a 28°C.....	31
Figura 5-2.	Siembra de <i>P. ostreatus</i> en medio PDA a diferentes concentraciones de clorpirifos.....	32
Figura 6-2.	Preparación y esterilización de semillas de trigo y cebada.....	33
Figura 7-2.	Siembra de <i>P. ostreatus</i> en semillas de trigo y cebada.....	34
Figura 8-2.	Preparación de la suspensión de <i>P. ostreatus</i> para su posterior siembra en el primer tratamiento.....	35
Figura 9-2.	Siembra y homogenización de semillas de trigo colonizadas con <i>P. ostreatus</i> ...	35
Figura 10-2.	Incubación de los tratamientos en oscuridad (Primera etapa).....	36
Figura 1-3.	Micelio de <i>P. ostreatus</i> al cuarto día posterior a la siembra.....	39
Figura 2-3.	Micelio de <i>P. ostreatus</i> al doceavo día posterior a la siembra.....	40
Figura 3-3.	Cultivo de siete días de <i>P. ostreatus</i> - control (Izq.) y con clorpirifos al 50 mL/L (Med.) y 200 mL/L (Der.).....	41
Figura 4-3.	Cultivo de 18 días de <i>P. ostreatus</i> con clorpirifos a 50 mL/L.....	41
Figura 5-3.	Crecimiento de micelio de <i>P. ostreatus</i> en semillas de trigo y cebada.....	42

Figura 6-3.	Crecimiento de micelio de <i>P. ostreatus</i> después de 15 días de incubación en oscuridad.....	43
Figura 7-3.	Presencia de primordios en el tratamiento uno, diez días después de iniciada la segunda etapa de fructificación.....	43
Figura 8-3.	Cuerpos fructíferos en el tratamiento dos, 11 días después de iniciada la segunda etapa de fructificación.....	44
Figura 9-3	Formación de cuerpos fructíferos en el tratamiento dos, 11 días después de iniciada la segunda etapa de fructificación.....	45

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-2.	Esquema del proceso.....	27
Gráfico 1-3.	Resultados obtenidos de la primera pregunta de la encuesta realizada a los agricultores de la comunidad Sagrado Corazón de Jesús.....	37
Gráfico 2-3.	Resultados obtenidos de la segunda pregunta de la encuesta realizada a los agricultores de la comunidad Sagrado Corazón de Jesús.....	38
Gráfico 3-3.	Resultados obtenidos de la tercera pregunta de la encuesta realizada a los agricultores de la comunidad Sagrado Corazón de Jesús.....	38
Gráfico 4-3.	Comparación del promedio de la concentración final de clorpirifos de cada tratamiento con la concentración inicial presente en el suelo.....	48
Gráfico 5-3.	Comparación de los porcentajes de degradación promedio obtenidos en cada tratamiento.....	49

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: FORMATO DE LAS ENCUESTAS REALIZADA A LA COMUNIDAD SAGRADO CORAZÓN DE JESÚS.

ANEXO B: EVIDENCIA FOTOGRÁFICA DE LA METODOLOGÍA SEGUIDA.

RESUMEN

El presente proyecto de investigación fue realizado con el propósito de evaluar la eficiencia del hongo *Pleurotus ostreatus* en la biodegradación de suelos contaminados con clorpirifos. Para la fase inicial de recopilación y análisis de información, se consideraron como datos referenciales la información que consta en el Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial vigente de la parroquia San Luis. En la fase in situ, para obtener la información, se efectuaron 53 encuestas en la comunidad Sagrado Corazón de Jesús, dirigidas hacia los agricultores de la zona; para determinar la cantidad y proporciones de usuarios de cultivos de tomate riñón bajo invernadero y cuyo plaguicida de uso fuese “Lorsban”, principal ingrediente activo de los clorpirifos. Complementariamente se determinó la concentración de clorpirifos en el suelo, dando como resultado una concentración inicial de 380 ppm en el parámetro mencionado. Además, paralelamente para la obtención del micelio del hongo, se logró extraer una muestra madre para luego ser replicada en con las condiciones ambientales requeridas, mismas que se detallan documentadamente en bibliografía disponible. Finalmente, para el análisis en laboratorio de los porcentajes de degradación de *Pleurotus ostreatus*, solo y en presencia de trigo (*Triticum spp*) y cebada (*Hordeum vulgare*) como sustratos de crecimiento, se desarrollaron tres tratamientos, obteniendo los siguientes resultados: el ensayo de menor concentración final de clorpirifos fue el tratamiento tres (*P. ostreatus* + trigo + suelo) con 128,33 ppm, seguido del tratamiento dos, (*P. ostreatus* + cebada + suelo) con 139,67 ppm y finalmente el tratamiento uno (*P. ostreatus* en suspensión + suelo) con 210,33 ppm. Por lo tanto, el tratamiento que alcanzó la mayor efectividad debido a una mayor tasa de degradación de clorpirifos, fue el que emplea el *pleurotus ostreatus* en sinergia con el trigo y el suelo agrícola.

Palabras clave: <BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL>, <CONTAMINACIÓN DEL SUELO>, <PLAGUICIDAS>, <HONGO OSTRA (*Pleurotus ostreatus*)>, <BIODEGRADACIÓN>, <CONTROL BIOLÓGICO>, <REMEDIACIÓN>, <SAGRADO CORAZÓN DE JESÚS (COMUNIDAD)>.



26/01/2021

0579-DBRAI-UPT-2021

ABSTRACT

The current research work was carried out in order to evaluate the efficiency of *Pleurotus ostreatus* mushroom in the biodegradation of chlorpyrifos-polluted soils. For the initial stage with regard to the information analysis and collection, some referential information which is part of the current Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial belonging to San Luis Parish was taken into account. In the on-site stage, for collecting information it was necessary to apply 53 surveys to farmers from Sagrado Corazón de Jesús community to determine the number of users as well as the proportion of riñón tomato crops grown in a greenhouse and which pesticide was "Lorsban" as the main active ingredient of chlorpyrifos. As a complementary stage, it was possible to determine the chlorpyrifos soil concentration, resulting in an initial concentration of 380 ppm. Parallel to the obtaining of the mushroom mycelium, it was possible to extract a mother sample for its further replication under the required environmental conditions, the ones which are documented and detailed in available bibliography. Finally, for the degradation laboratory analyzes of *Pleurotus ostreatus* in an isolated way as well as together with wheat (*Triticum spp*) and barley (*Hordeum vulgare*) as growing substrata, three treatments were applied with the following results: The chlorpyrifos lowest concentration final testing belonged to treatment three (*P. ostreatus* + wheat + soil) with 128,33 ppm, followed by treatment two, (*P. ostreatus* + barley + soil) with 139,67 ppm, finally treatment one (*P. ostreatus* in suspension + soil) with 210,33 ppm. Thus, the treatment with the highest effectiveness due to a greater chlorpyrifos degradation rate was the one that uses *pleurotus ostreatus* in synergy with wheat and agricultural soil.

Key words: <ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY>, <SOIL POLLUTION>, <PESTICIDES>, <OYSTER MUSHROOM (PLEUROTUS OSTREATUS)>, <BIODEGRADATION>, < BIOLOGICAL CONTROL>, <REMEDICATION>, <SAGRADO CORAZÓN DE JESÚS (COMMUNITY)>.

INTRODUCCIÓN

La contaminación y sus consecuencias son producto de las actividades de tipo industrial, agrícola o de servicios, siendo el área industrial la principal fuente de residuos contaminantes (Silva Moran, 2017) Actualmente, los niveles de contaminación ambiental han alcanzado un punto de quiebre en el cual los ecosistemas naturales y sus recursos están seriamente amenazados. Uno de estos recursos es el suelo, este ha sido alterando por la generación directa, voluntaria o involuntaria de una gran variedad de residuos y contaminantes, modificando la dinámica natural de los ecosistemas.

Las nuevas tecnologías en una sociedad industrializada han permitido sintetizar múltiples compuestos de tipo orgánico, destinados a satisfacer un sin número de necesidades. Una ingente cantidad y variedad de elementos químicos orgánicos se producen al año en el planeta, solo los Estados Unidos es capaz de producir más de 60 millones de toneladas métricas. En esta cantidad se incluye los plásticos y plastificantes, lubricantes y refrigerantes, combustibles y disolventes, plaguicidas y fertilizantes (Brady y Weil, 2008, pp. 850-860)

Cuando se habla de la contaminación del suelo a partir de compuestos orgánicos, se considera básicamente a la ocasionada por los productos elaborados a base del petróleo. El hombre, en el transcurso del tiempo ha sido capaz de transformar el petróleo en combustible y varios productos que son básicos para el desarrollo productivo de las sociedades (Hernández, Álvarez y Ríos, 2017, pp. 139-159). Formando parte del conjunto de contaminantes de tipo orgánico que se derivan del petróleo están los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). Estos conforman una familia especial de compuestos que se constituyen a partir de un mínimo número de anillos bencénicos unidos a dos o más átomos de carbono.

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos son la base de una gran variedad de plaguicidas. Los cuales han tenido una fuerte presencia y acogida en los últimos años, ya que estos productos permiten dar un control eficiente a plagas indeseadas en cultivos agrícolas. De esta forma es posible que los cultivos puedan producir más y al mismo tiempo se obtiene un producto sano. La parte negativa y la que ha causado una gran polémica a nivel mundial viene dada debido a que una aplicación excesiva llega a ser tóxica para los suelos y contamina los recursos naturales que se encuentren a su alrededor.

Formando parte de los plaguicidas de mayor aplicación agrícola a nivel mundial están los compuestos organofosforados (OPs), ya que son de bajo costo y poseen una gran efectividad (Ramírez, J y Lacasaña, 2001). Los clorpirifos son compuestos organofosforados cuya molécula es la

base de una gran variedad de insecticidas. Estos se aplican para el control de moscas, mosquitos, plagas domésticas, larvas acuáticas y diversas plagas de cultivos que se dan en el suelo o en las hojas (Petter et al. 2012)

A nivel agrícola su aplicación es de forma directa a los cultivos, por su gran adherencia a las partículas del suelo y aún más en aquellos que tienen gran contenido orgánico. Al momento que llega a formar parte del ambiente, este se degrada con la ayuda de la luz solar, bacterias u otros procesos químicos. Se ha determinado que su permanencia en el suelo puede ser de algunos días o años, en el caso de los productos de consumo esta varía de 3 a 60 días (Koshlukova y Reed, 2014). Además, se debe considerar que este compuesto ha sido encontrado en múltiples muestras de agua tanto subterráneas como superficiales y potables.

Debido a la persistencia de este tipo de compuestos en el suelo, a los daños que ocasionan con el tiempo y que se ha determinado que son altamente contaminantes producto de su acumulación; son varias las propuestas que se han planteado para recuperar las áreas contaminadas. La biorremediación es un método eficiente que en la actualidad se está aplicando para degradar los contaminantes del ambiente como es el caso de los pesticidas. Estos se pueden implementar *in situ*, sin que sea necesario movilizar o transportar el material que se encuentre contaminado. Una parte importante de este método es que no se genera otro tipo de contaminantes durante el proceso de remediación, esto ha hecho que sea ampliamente aceptada por el público en general (Demnerova y Otros, 2005, pp. 205-211).

Diversas investigaciones de los últimos años han demostrado que la biorremediación se puede transformar en una de las primeras opciones a considerarse cuando se trata de recuperar suelos contaminados. Formando parte de los avances alcanzados en los procesos investigativos, está el uso de un grupo de organismos cuyas características ecológicas los hacen distintos al resto, estos son los hongos de pudrición blanca. La relevancia que tienen este tipo de organismos se fundamenta en la capacidad de degradar un sin número de contaminantes orgánicos y compuestos que son persistentes en el ambiente entre los cuales están los clorofenoles, dioxinas, aminas aromáticas, fenoles organofosforados e hidrocarburos policíclicos aromáticos (Sifuentes, E. 2014)

Pleurotus ostreatus es un hongo de la pudrición blanca con una gran relevancia a nivel económico, gastronómico y medicinal normalmente se le conoce como hongo ostra o seta. Este se produce de forma industrial como alimento para el consumo humano, convirtiéndose en el tercer hongo que más se cultiva en el mundo (Cohen, Persky y Hadar, 2002, pp. 582-594). Este hongo posee una característica enzimática muy particular, ya que su complejo multienzimático al estar conformado por lacasas, peroxidasas y glucosidas le confiere la posibilidad de degradar varios compuestos de tipo lignocelulósicos. La capacidad de sus enzimas ha sido aprovechada

en múltiples metodologías de biorremediación, en las cuales se ha degradado los contaminantes que forman parte de varios tipos de insecticidas, colorantes, herbicidas y fungicidas, entre otros (Blue, Gomes y Roberto, 2006, pp.468-473).

JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Los plaguicidas organofosforados son los más utilizados por los agricultores para el control de plagas en cultivos de tomate riñón bajo invernadero, donde el gusano trozador (*Agrotis* sp.) y el pulgón (*Aphis* sp.) se consideran como las plagas que más atacan a este tipo de cultivos. En la parroquia San Luis uno de los más utilizados es el Lorsban, cuyo ingrediente activo son los clorpirifos. Esto debido a que tiene un precio de venta bajo y posee una gran eficiencia una vez que es aplicado, a pesar de esto, su uso de forma intensiva causa la degradación de los suelos.

Los beneficios que aporta este insecticida en el normal desarrollo del cultivo están sujetos a serias alteraciones en los suelos, entre las que se puede destacar la pérdida de fertilidad del suelo, de su capacidad biodegradadora y la pérdida de su biodiversidad. Disminuir la presencia de los contaminantes en el suelo y revertir su infertilidad requiere de una inversión de tiempo y dinero alta, por esta razón los agricultores optan por convertir áreas protegidas como el páramo, en nuevas superficies cultivables. Recursos naturales como el suelo, son esenciales para el desarrollo económico y social de las personas, por ende, recuperarlos y conservarlos es importante para garantizar un ambiente sano con una dinámica ecológica equilibrada.

En este contexto, resulta primordial buscar nuevas metodologías que permitan reducir, no solo la aplicación de este tipo de plaguicidas, sino aquellas con las cuales se consigan degradar de forma rápida y a un bajo costo los contaminantes que se encuentran en el suelo. De esta forma se disminuirá el impacto que tienen en los componentes abióticos y bióticos del ambiente. Los procesos de biorremediación se presentan como una alternativa ecológicamente sustentable, la cual aprovecha el potencial metabólico y enzimático de los microorganismos para biodegradar los contaminantes.

El presente trabajo investigativo se plantea como una alternativa ecológica para la remoción de los clorpirifos del suelo. Considerando que se ha demostrado la eficiencia de *Pleurotus ostreatus* al momento de disminuir las altas concentraciones de otros tipos de contaminantes presentes en plaguicidas, insecticidas, hidrocarburos o metales pesados que se han registrado tanto en el suelo como en el agua. Para esto se evaluará la capacidad biodegradadora de *Pleurotus ostreatus* en muestras de suelo con presencia de clorpirifos, provenientes de cultivo de tomate de la zona agrícola de la parroquia San Luis.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

General:

Evaluar la eficiencia del hongo *Pleurotus ostreatus* en la biodegradación de suelos contaminados con clorpirifos.

Específicos:

- Cuantificar la concentración de clorpirifos presente en muestras de suelo provenientes de cultivos de tomate riñón de la parroquia San Luis.
- Determinar la inhibición del crecimiento de *Pleurotus ostreatus* a diferentes concentraciones de clorpirifos a nivel de laboratorio.
- Establecer el porcentaje de degradación de clorpirifos presente en el suelo por efecto de *Pleurotus ostreatus*.
- Analizar los porcentajes de degradación de *Pleurotus ostreatus*, solo y en presencia de trigo y cebada como sustratos de crecimiento.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. El suelo

El aire, la capa de ozono, la cubierta vegetal, el suelo y el agua, constituyen los elementos ambientales indispensables para que la tierra adquiriera la capacidad para albergar la vida. La parte sólida de la tierra, denominada geósfera, es donde se producen los procesos químicos; esta sección del planeta se constituye por el conjunto de rocas y material mineral. El suelo es una parte muy importante de la geósfera que tiene la función de dar cabida al normal desarrollo de la vegetación, la cual es la base del alimento de todos los seres vivos (Villacís, J. 2013, p. 15) .

La interacción de los componentes del planeta, anteriormente descritos, producen numerosos procesos químicos y biológicos, uno de ellos es la degradación natural. El suelo tiene una importante característica de que, cuando se produzca algún tipo de alteración, recupera la dinámica estructural, recobrando así su estado de equilibrio normal. A esta característica se la llama resiliencia (Brady y Weil, 2088, pp.850-860). Los parámetros que determinan la resiliencia en el suelo son: la resistencia del suelo, las propiedades físicas, químicas y biológicas de cada tipo de suelo y su cubierta vegetal (Siebe, Jahn y Stanhr, 2006, p.64).

La capacidad de resiliencia que tiene el suelo, se relaciona enormemente con los diferentes tipos de climas que se presentan alrededor del planeta. Por ejemplo, debido a la cantidad de precipitaciones, la distribución geográfica o los cambios de temperatura, determinan el desarrollo normal de infinidad de procesos físicos, químicos y biológicos, los cuales provocan una adecuada protección y auto regeneración del suelo

Entre los factores que se toman en cuenta, en la determinación de la resistencia del suelo a la degradación o alteración, se encuentran el nivel de la intensidad de las actividades agrícolas, industriales o mineras, el régimen de implementación y la duración. Otro parámetro a ser considerado constituye los distintos tipos de uso que tiene el suelo. Estos indicadores determinaran qué tan resistente puede llegar a ser un suelo a los procesos de degradación(Gimsing et al. 2011, pp.1-3).

1.1.1. Importancia del suelo en el ambiente

El suelo tiene una función relevante en el normal desarrollo de los organismos en el planeta. Las funciones que se dan en el suelo de acuerdo con sus características y sus usos potenciales se detallan en la tabla 1-1.

Tabla 1-1. Funciones ecológicas del suelo

Potenciales	Funciones Ecológicas	Criterios
Documental	Elemento natural	Perfiles del suelo
Biótico	Superficie para el desarrollo de la vegetación.	Biodiversidad de los organismos, rendimientos, propiedades fisicoquímicas y biológicas del suelo.
Abiótico	Filtro, área de amortiguamiento, escurridero, transformación, regula el ciclo hídrico.	Cantidad y calidad de la recarga de sistemas lacustres y redes hídricas, calidad de aire, escurridero.
De área	Construcción, sostén de elementos vegetales.	Extensión, capacidad de carga, resistencia a la penetración

Fuente: Villacís, J. (2013)

Realizado por: Minta, Jessica, 2020.

Según el criterio de Villacís, J. (2013. pp. 20-25), el suelo tiene 6 funciones esenciales para el normal desarrollo de todo ecosistema del cual forma parte:

1. El suelo proporciona el área apta en la cual se desarrolla la vegetación, proveyendo al sistema radicular de todos los macro y micronutrientes elementales para un normal crecimiento.
2. La regulación del ciclo hidrológico tiene una relación muy importante con las propiedades físicas del suelo. En todos los perfiles del suelo, se desarrollan los procesos de disminución, implementación, contaminación y purificación del recurso hídrico.
3. El suelo funciona como un complejo sistema de reciclaje dinámico. Este ocupa y asimila todos los residuos de las plantas, los animales y los humanos para convertirlos a sus elementos básicos, de esta forma vuelven a estar disponibles para ser utilizados por las siguientes generaciones.
4. El suelo es el hábitat o medio de vida de un sin número de microorganismos, insectos, reptiles, mamíferos y el ser humano.

5. El suelo tiene la propiedad de captar y liberar una enorme cantidad de dióxido de carbono, oxígeno y otros gases, por lo que se constituye en una parte fundamental de los procesos de autorregulación a nivel de la atmósfera.

6. El suelo también juega un papel muy importante, como recurso de ingeniería, en lo referente a los ecosistemas que son construidos por el ser humano. Su importancia no solo radica en que se constituye como el único proveedor de la materia prima para la elaboración de ladrillos, cemento, adornos, etc.; sino que también representa la superficie base para la construcción de caminos y edificaciones.

En consecuencia, con lo anterior, se puede afirmar que el suelo constituye un recurso natural fundamental para la actividad económica, por ser un insumo esencial para actividades como las agrícolas y ganaderas. Sin embargo, es un recurso bastante vulnerable, pues la sobreutilización del suelo mediante dichas actividades puede deteriorarlo de forma irreversible. Esto genera que el suelo pierde sus funciones ambientales y, por ende, disminuyen sus bienes y servicios. Específicamente, el uso de sustancias tóxicas, como los plaguicidas, puede llegar a generar efectos negativos en el recurso suelo, debido a que sus características fundamentales como persistencia, vida media y toxicidad, entre otras, pueden degradar los componentes de este recurso y llevarlo a su destrucción (Silva y Correa, 2009, pp. 2-5).

1.2. Contaminación del suelo

La implementación de un sin número de actividades antropogénicas o producidas por el ser humano, trae como consecuencia la contaminación de los suelos. Una de las principales actividades contaminantes es la producción de tipo industrial a gran escala para la elaboración de tintes, productos sintéticos, preservantes para la madera o conservantes para los alimentos. Además de todos los procesos que se implementan al momento de extraer, transportar, refinar, transformar y usar el petróleo y sus derivados (Sifuentes, E., 2014, p.4).

El suelo contaminado representa un indicador de que en su estructura existen uno o varios componentes químicos que tienen la capacidad de alterar la dinámica del ecosistema y compromete la funcionalidad y sustentabilidad del mismo. El nivel de contaminación que se puede tener en un suelo está ligado a la concentración o proporción de residuos líquidos, sólidos o gaseosos que se han colocado en este, sin importar que sea de forma accidental o intencional (Dias et al., 2008, pp.23-25).

La aplicación en exceso de fertilizantes, plaguicidas y gran variedad de compuestos químicos, que por lo general sucede por el derrame de los residuos líquidos o sólidos, hacen que el suelo agrícola sufra contaminación. Los suelos, sin importar tenga niveles bajos o altos de

contaminación, se convierten en una seria amenaza para las personas que están en un contacto continuo. Además, en varios escenarios un suelo contaminado se transforma en un elemento contaminante del recurso hídrico, esto tiene lugar debido a varios procesos como la infiltración o la escorrentía superficial. Los cuales ocasionan que durante las precipitaciones como consecuencia del arrastre que se producen en la superficie del suelo, los contaminantes sean llevados a los cuerpos hídricos como ríos, lagunas o acuíferos (Gresham, T. 2012, p.4).

1.2.1. Tipos de contaminantes del suelo

De acuerdo a lo establecido por Nápoles y Ábalos (Villacís, J., 2013, pp.4-5) se diferencian dos grupos de contaminantes en el suelo: contaminantes orgánicos e inorgánicos.

1.2.1.1. Contaminantes orgánicos

Entre los contaminantes orgánicos están aquellos que conforman el grupo llamado BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno), fenoles, policlorobifenilos (PCBs), hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) y plaguicidas. Estos se encuentran en cuatro formas variadas en el suelo: vapor, disolución acuosa, líquido no acuoso o adsorbidos en los sólidos y coloides.

1.2.1.2. Contaminantes inorgánicos

En este tipo de contaminantes se destacan los metales pesados, mismos que a su vez se clasifican en dos subgrupos:

- **Tóxicos en concentraciones altas.** como el cobre, zinc, manganeso, hierro y cromo.
- **Tóxicos en concentraciones bajas.** como el cadmio, mercurio, plomo, níquel, selenio, arsénico.

1.3. Los Plaguicidas

Uno de los principales problemas del sector agrícola, y que afectan a los cultivos, son las plagas, que se las definen como “cualquier tipo de organismo que tienen la capacidad de disminuir la cantidad o calidad de los cultivos, incrementando los costos de producción y disminuyendo el valor final de la cosecha” (Cano et al. 2004). Por esta razón es muy importante contar con un medio para controlar el problema de las plagas, la técnica más utilizada a nivel mundial es el uso de compuestos químicos denominados plaguicidas. Es así como el número de principios activos y formulaciones de plaguicidas registradas en el mundo ha crecido exponencialmente (Campos, 2016, pp. 3-4).

Se define también a un plaguicida, como toda sustancia o combinación de las mismas, que se aplican en el ambiente, a los animales o plantas, para prevenir, controlar y combatir a todos los organismos que ocasionan algún tipo de daño a los seres humanos, animales, plantas, semillas y objetos inanimados, como es el caso de la madera.

Dentro del término plaguicida se reúnen un conjunto de compuestos químicos con propiedades químicas y aplicaciones biológicas heterogéneas, estas se clasifican en: herbicidas, insecticidas, mosquicidas, fungicidas y rodenticidas (Cavieres,F. 2004). Sin importar que los plaguicidas mejoren la producción de los cultivos, siempre ha existido la preocupación sobre las consecuencias que estos pueden traer para la salud humana y su impacto en el ambiente (Campos,N., 2016, pp.3-5).

1.3.1. Características de los plaguicidas

En forma extensa y exclusiva, los plaguicidas, se los utiliza en la agricultura, para combatir todo tipo de plagas y las consecuencias que provocan estas. Las características tóxicas que presentan los plaguicidas sobre las especies que actúa, no representan un problema, debido a que esa propiedad es la base para medir su eficacia y una de las razones de su implementación. Sin embargo, el principal problema que se deriva de la utilización de plaguicidas es la falta de selectividad, que ocasiona que cuando se aplica, la toxicidad del plaguicida afecta a otras especies que no son el objetivo principal. Esta consecuencia no intencionada que se presenta en otros tipos de organismos ha obligado a que se considera estimaciones previas de los posibles impactos ambientales como una manera de disminuir los efectos en los organismos y los variados ecosistemas (Silva y Correa, 2009).

Existen algunos impactos que se producen en el ambiente por la acción de los plaguicidas, como son la disminución de la actividad microbiana del suelo, el crecimiento irregular, la reducción de la biomasa o muerte de la vegetación que es sensible a estas sustancias y los efectos que se manifiestan en la salud de las personas. En la tabla 2-1 se describen los efectos que tienen los plaguicidas en el agua y en el suelo (Silva y Correa, 2009).

Tabla 2-1. Tipos de plaguicidas y sus efectos

Tipos de plaguicidas	Efecto
Herbicidas	
Ácidos aromáticos	Un exceso de residuos ocasiona daños en las cosechas posteriores
Aminas, anilinas, nitrilos, esterres, carbamatos.	Su persistencia tiende a causar daños en cosechas posteriores
Insecticidas	

Organoclorados	Los residuos ocasionan daños s cosechas futuras, la movilidad en las aguas superficiales afecta a la vegetación aledaña
Organofosforados, carbamatos, piretroides	Los efectos sobre las plantas son por acumulación

Fuente: (Silva y Correa, 2009).

Realizado por: Minta, Jessica, 2020.

1.3.2. Contaminación del suelo por clorpirifos (Plaguicida Organofosforado)

Los plaguicidas que son usados con mayor intensidad en la agricultura están los compuestos organofosforados (OPs), por su bajo costo de producción y la gran efectividad que tienen una vez que son aplicados (Ramírez, J y Lacasaña, 2001, pp.67-75). Estos se utilizan para el control de plagas en una gran variedad de cultivos, debido a que, a más de eliminar de forma directa a los insectos, estos compuestos llegan a ser absorbidos por la vegetación, lo que las hace tóxicas para los organismos que se desean combatir (Muñoz, M., 2011, pp. 95-104). Uno de los compuestos organofosforados que más se utiliza de este grupo son los Clorpirifos [O, O-dietil O-(3,5,6-tricloropiridin-2-il) fosforotioato], éste es un sólido cristalino de coloración blanca. Sus características más importantes se describen en la tabla 3-1.

Tabla 3-1. Características de los clorpirifos

Características	Descripción
Formula Molecular	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS
Masa Molecular	350.6 g/mol
Solubilidad en agua a 20 C	0.39 – 1.05 mg/l
Log Kow a 20 °C	4.7 – 5.11
Punto de ebullición	145 – 160 °C
Punto de fusión	42 – 43 °C

Fuente: Ramírez y Lacasaña (2001)

Realizado por: Minta, Jessica, 2020.

Los Clorpirifos constituyen un insecticida muy utilizado en las actividades agrícolas, para controlar moscas, mosquitos, plagas domésticas, larvas acuáticas y una gran variedad de plagas que están presentes en el suelo o las hojas de los cultivos. La aplicación se la realiza de manera directa al cultivo, debido una de sus principales características, como es la alta adherencia que tiene a las partículas del suelo, principalmente a los que poseen un alto contenido de materia orgánica (ATSDR, 1997, pp.2-4).

Algunas investigaciones han determinado que los clorpirifos tienen una gran persistencia en el suelo, pudiendo estar presentes hasta más de 4 años. En el caso de los vegetales el rango de tiempo varía aproximadamente entre 3 y 60 días. Además, este compuesto se ha registrado en análisis de muestras de agua tomadas en acuíferos, ríos y en agua destinada para el consumo humano (Martínez et al., 2008: pp. 247-260). En función al modelo de distribución de Clorpirifos, un 49,64% está presente en el suelo, el 46,33% en sedimentos y el 2,29% se encuentra en el agua. Los porcentajes antes mencionados dependen de la tasa de aplicación, el ecosistema donde este se aplique y los factores ambientales como temperatura o precipitaciones (Campos, N. 2016, pp.5-6).

La Agencia de Protección del Medio Ambiente, ha ubicado a los Clorpirifos en una clasificación de clase II o moderadamente tóxico como un insecticida (EPA citado en Campos, 2016, p.6). Esto quiere decir que el grado de afección al sistema nervioso central es moderado, ya que posee un efecto inhibitorio de la enzima acetilcolinesterasa, encargada de transmitir los impulsos nerviosos. En el caso de los seres humanos, respirar o ingerir este compuesto ocasiona dolores de cabeza, visión borrosa y salivación, hasta llegar a producir convulsiones e incluso llegar a la muerte (ATSDR, 1997, pp.2-4), esto dependerá de la cantidad, concentración y el tiempo de exposición. Además, este compuesto puede llegar a ser muy tóxico tanto para la vida acuática y los organismos invertebrados (Giesy et al., 1999, pp.3-9).

1.3.2.1. Características fisicoquímicas de los clorpirifos

La molécula de los clorpirifos tiene una clasificación de poco soluble, debido a que su ingrediente activo posee una solubilidad en agua a 20°C de 1,05 mg/L. Por ello tiene una alta afinidad con las partículas del suelo, acumulándose en éste y llegando a sedimentarse. Tiene un peso molecular de 350,6, por lo que, por su tamaño, es difícil que se disuelva en agua. Tiene una presión de vapor de 3.35×10^{-3} Pa a 25°C, este valor lo clasifica como un compuesto volátil que puede dispersarse en un área extensa. En combinación con soluciones acuosas neutras o ácidas es estable, sin embargo, su estabilidad se reduce al incrementar el pH.

1.3.2.2. Propiedades eco toxicológicas de los clorpirifos

Los clorpirifos pertenecen a una gran variedad de insecticidas de amplio espectro, por lo que pueden llegar a ser altamente tóxicos para un sin número de insectos. Uno de los principales problemas que se produce, es que, al no ser selectivo dentro del control de las plagas, se eliminan también a especies beneficiosas para el ambiente como es el caso de las abejas, mariquitas y avispa. La alta toxicidad que tiene los clorpirifos se evidencia también en artrópodos de tipo acuático, esto ha sido comprobado tanto en investigaciones de campo como en las realizadas a

nivel de laboratorio. En el caso de los peces es tóxico incluso a bajas concentraciones, disminuyendo su crecimiento o produciendo un crecimiento anormal; el grado de afección se reduce cuando se trata de invertebrados acuáticos.

Los clorpirifos llegan a bioconcentrarse en una gran variedad de organismos acuáticos, pueden llegar a ser moderadamente tóxicos en mamíferos que se encuentren bajo condiciones de exposición aguda, en el caso de las aves, estas son más vulnerables con un nivel de toxicidad que se encuentra en el rango de alta a muy alta.

1.3.2.3. Persistencia de clorpirifos

En el caso de la persistencia el valor DT50 para la degradación a nivel del suelo es de 120 días, incluso varios reportes han determinado que su vida puede llegar a ser de hasta 4 años. Por lo tanto, se considera que este compuesto químico (Figura 1-1) es persistente en el suelo.



Figura 1-1. Estructura de los clorpirifos

Fuente: Colquier (2017)

1.4. Biorremediación

Se denomina biorremediación al método mediante el cual se utiliza la actividad biológica de los microorganismos y plantas para lograr modificar o degradar una gran variedad de contaminantes, con lo que se obtiene como resultado sustancias inertes que no provocan ninguna clase de daño o alteración al medio ambiente. También, a la biorremediación se la define como una “tecnología de biorrestauración orientada para ambientes naturales que han sido contaminados con compuestos xenobióticos, manipulando la capacidad metabólica que poseen las bacterias, hongos, levaduras, alga, plantas y nutrientes para incrementar la velocidad de los procesos de biodegradación natural que tienen los ecosistemas” (Nápoles, J y Ábalos, 2010, pp. 6-7).

Las etapas de mineralización de los contaminantes orgánicos que constituye la capacidad que presentan los microorganismos para la transformación de los contaminantes orgánicos en dióxido de carbono, agua y biomasa; estas etapas se encuentran relacionadas con los procesos biológicos que suceden en los suelos contaminados. La biorremediación se implementa con los organismos propios (autóctonos) del área contaminada o de otras áreas (exógenos), su aplicación puede realizarse in situ o ex situ, en condiciones de tipo aerobias cuando hay presencia de oxígeno o anaerobias cuando no se tiene la presencia del oxígeno (Volke y Velasco, 2002, pp.33-34).

Las ventajas que se logran utilizando los procesos de biorremediación son:

- La percepción del público, sobre la biorremediación por ser un proceso natural, es considerarlo un método de recuperación de residuos correcto y adecuado para las áreas contaminadas del suelo. Los residuos generados mediante estos métodos son generalmente productos inofensivos para el ambiente, como es el caso del dióxido de carbono, el agua y la biomasa celular.
- Mediante la biorremediación se logra la degradación parcial o completa de una infinidad de contaminantes, muchos de ellos sumamente peligrosos, los cuales se transforman en productos inocuos e inofensivos para el ambiente. Esto permite eliminar por completo la posibilidad de una responsabilidad compartida con los tratamientos de recuperación y supresión del material contaminado.
- Los procesos de remediación se los puede implementar en el sitio afectado sin interrumpir las actividades normales de las poblaciones aledañas. Con ello, no es necesario transportar los residuos contaminados fuera del área de afectación y no existen riesgos para la salud humana y el ambiente al transportar los residuos.
- En relación a otras tecnologías y procedimientos que se aplican para la recuperación de áreas contaminadas, la biorremediación puede llegar a tener un costo final más bajo (Villacís, J., 2013, p.35).

1.4.1. Métodos de biorremediación

Los métodos de biorremediación dependen de los microorganismos que están en forma natural en el suelo, por ello son muy seguros. Son también útiles y especialmente no representan ningún riesgo para el ser humano. Estos métodos no utilizan ningún químico peligroso y los nutrientes complementarios encargados del desarrollo de los microorganismos son utilizados en forma común como es el trigo, avena, cebada o césped. Además, todos los métodos tienen la capacidad

de transforman los químicos contaminantes en agua o gases inocuos, por lo que estos son completamente degradados (EPA citado de Campos,2016, pp.17-22).

En función como se implementan los procesos de biorremediación, se diferencian dos tipos de tecnologías que son la biorremediación in situ y la biorremediación ex situ.

1.4.1.1. Métodos in situ

Este método resulta la alternativa más idónea para la recuperación de los suelos contaminados, debido a que no es necesario prepara o remover el material contaminado. Sin embargo, primero se debe valorar los diferentes factores que pueden influir al momento de su implementación, como son los impactos ambientales que se generan en el área afectada, las actividades industriales que se pueden detener, los costos de implementación en comparación con otros métodos, el grado de dificultad para ingresar al área afectada para dotar de oxígeno y nutrientes o la velocidad del proceso. (Suarez, R., 2013, pp.23-31)

Entre los métodos in situ que más se utilizan están los siguientes:

- **Fitorremediación.** En este método se implementan plantas para la remoción, transferencia, estabilización y destrucción de los contaminantes tanto orgánicos como inorgánicos a nivel del suelo, lodos o sedimentos. Es eficiente para degradar solventes hidrocarburos, agroquímicos clorados y organofosforados o metales pesados.
- **Bioventilación.** Este método utiliza aire comprimido en el área afectada con la finalidad de promover el oxígeno requerido para mantener la actividad microbiana y por ende la degradación de los contaminantes.
- **Biolabranza.** El área afectada es tratada mediante arados continuos con el objetivo de mezclar el suelo contaminado con suelo limpio, además de que se facilita la aireación. Se utiliza por lo general para suelos contaminados con gasolina y aceites.
- **Bioaumentación.** La bioaumentación utiliza microorganismos como hongos o bacterias que tengan la capacidad de degradar los contaminantes para facilitar la recuperación de los suelos contaminados. La eficiencia de este método se ha probado en la degradación de herbicidas y plaguicidas.

(Sifuentes, E., 2014, p.8)

1.4.1.2. Métodos ex situ

Los métodos ex situ consisten en el traslado del suelo contaminado del área afectada para implementar los procesos de degradación en otro lugar bajo condiciones controladas, que pueden ser a nivel de laboratorio o implementando estaciones móviles que hagan factible aplicar el método seleccionado. Este método tiene el inconveniente de que en la mayoría de casos es imposible implementarlo debido a que tiene una mayor inversión. (Suarez, R., 2013, pp. 38-22)

Los métodos ex situ más utilizados son los siguientes:

- **Biorreactores.** El proceso de degradación se realiza en fase acuosa debido a que el suelo contaminado se mezcla con un líquido, en este caso los microorganismos en suspensión o inmovilizados en la fase sólida. También es posible implementar reactores secuenciales de lodos a nivel aerobio o anaerobio.
- **Compostaje.** En el método de compostage, los suelos contaminados son mezclados con materiales complementarios como paja, heno, orines, estiércol o residuos agrícolas, con ello se mejora los nutrientes, se asegura una adecuada aireación y producción de calor. Esto facilita la activación de los microorganismos y se aceleran los procesos de degradación de los contaminantes.

(Sifuentes, E., 2014, p.8)

1.5. Micorremediación

La micorremediación es un proceso mediante el cual se implementa un cierto tipo de hongos que actúan como agentes biodegradadores, estos poseen la capacidad de degradar los contaminantes en función de la especie que se utilice. Además, sus hifas (red de filamentos que hacen de raíces) tienen la posibilidad de ingresar en el suelo contaminado y generar el material enzimático extracelular necesario para degradar los contaminantes. Los hongos que tienen la capacidad para descomponer la madera son generalmente efectivos degradando contaminantes aromáticos, clorados e hidrocarburos (Torres y Zuluaga, 2009, p.17).

1.5.1. Hongos saprófitos

Este tipo de hongos se alimentan de la materia orgánica muerta que está compuesta principalmente de polisacáridos existentes en la pared celular y otros biopolímeros, estos incluyen polímeros como celulosa, hemicelulosa, lignina y pectina, polisacáridos de los hongos (quitina) y polisacáridos de reserva de nutrientes (almidón) así como proteínas. Este grupo es fundamental en los ciclos de la mayoría de los macroelementos y sustancias indispensables para la vida. (Boddy, Frankland y West, 2008)

1.5.2. Grupos de hongos saprófitos

Una característica importante de este tipo de hongos es que pueden ser cultivados en ambientes controlados, debido a que son independientes de otros seres vivos y solo necesitan desarrollar un sustrato lignocelulósico determinado y tener 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. (Stamets, P., 2005, pp. 2-5)

1.5.2.1. Degradadores Primarios

Los depredadores primarios constituyen a los hongos llamados colonizadores y son los que inician el proceso de degradación. Este grupo incluye especies del género *Pleurotus*, *Lentinula edodes* y *Grifola frondosa*. Sin embargo, estas especies poseen sistemas enzimáticos distintos para degradar la materia orgánica en diferentes estadios de descomposición (Stamets, P., 2005, pp. 2-5).

1.5.2.2. Degradadores Secundarios

Este tipo de hongos acceden únicamente a sustancias orgánicas simples y 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* (Stamets, P., 2005, pp. 2-5).

1.5.2.3. Degradadores terciarios

Dentro de los degradadores terciarios se incluyen 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. En este grupo se encuentran especies de géneros como *Conocybe*, *Agrocybe*, *Mycena*, *Pruteus* y *Agaricus* (Stamets, P., 2005, pp. 2-5).

1.6. Aplicación de hongos filamentosos para biorremediación

La micorremediación consiste en la utilización de hongos para degradar o remover los compuestos contaminantes del ambiente, este proceso consiste en mezclar el micelio con el suelo contaminado, colocación de plantas de micelio en lugares tóxicos o una combinación de ambas técnicas en tratamientos sucesivos o de una sola aplicación (Sifuentes, E., 2014, p.11).

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 (Gadd G., 2001, p.472).

1.6.1. Hongos de pudrición blanca

Los basidiomicetos, son conocidos como hongos de pudrición blanca, son especies que tienen las características más adecuadas para utilizarlos en procesos de micorremediación y constituyen organismos capaces de degradar y mineralizar la lignina (Martin et al., 2004, pp.103-120). 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. 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 (Papinutti, Diorio y Forchiassin, 2003).

Los hongos de pudrición blanca tienen un complejo de enzimas oxidasas y peroxidasas, destinadas a catalizar las primeras reacciones que rompen las uniones dentro de la molécula de la lignina y generan moléculas más pequeñas. Luego se incorporan estos productos de degradación a los ciclos metabólicos del organismo para dar como producto final agua y CO₂ (Papinutti, Diorio y Forchiassin, 2003).

Este tipo de hongos tienen la capacidad de degradar o modificar diferentes sustratos tales como, pulpas papeleras, clorofenoles, hidrocarburos policíclicos aromáticos, lignina kraft, sustratos lignocelulósicos. Algunas de las especies más estudiadas y eficientes son: *Trametes versicolor*, *Grifola frondosa*, *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma applanatum*, *Ganoderma lucidum*, *Phanerochaete chrysosporium* entre otras (Quintero, Feijoo y Lema, 2006, pp.61-67).

1.6.1.1. Capacidad enzimática de los hongos de pudrición blanca

La presencia de un sistema de enzimas lignolíticas extracelulares, les dan a los hongos de pudrición blanca la capacidad única para degradar la lignina, entre estas enzimas que han sido caracterizadas están la Lignina Peroxidasa (LiP), Manganese Peroxidasa (MnP) y Lacasa (LAC), el patrón de expresión de estas enzimas depende de cada organismo. Algunos secretan LiP y MnP sin producir lacasas, mientras otros secretan MnP y no lacasas. 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 et al., 2010, pp.70-71).

Los procesos de biodegradación de los hongos, en especial la ecología de los basidiomicetos saprófitos en el suelo, tiene relación con el metabolismo de los contaminantes orgánicos. Esto favorece 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 (Papinutti, Diorio y Forchiassin, 2003).

1.6.2. Ventajas del uso de los hongos de pudrición blanca

La tecnología de biorremediación de los hongos de pudrición blanca, se diferencia de otros procesos de remediación, inclusive de la utilización de bacterias, debido principalmente a los mecanismos que se aplican, que representan una serie de ventajas para la degradación de contaminantes (Singh, H. 2006, p.48). Estos ventajas son:

1. Esta clase de hongos 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 conjuntamente con sustratos lignocelulósicos de bajo costo, los cuales se añaden a los sitios contaminados para incrementar la degradación de contaminantes por estos mecanismos.

6. Su crecimiento es por extensión de hifas, lo cual facilita la eficiente colonización y exploración del suelo, por lo tanto, pueden alcanzar contaminantes en el suelo en formas que otros organismos no.

1.7. *Pleurotus ostreatus* – Hongo Ostra

Pleurotus ostreatus es una especie de hongo saprófito perteneciente al grupo de los hongos de pudrición blanca más conocida 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 (Gaitan y Bouchard, 2006) (Gaitan, 2006, pp.893-899).

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. Sin embargo, para fines de esta investigación el hongo se trabajará a nivel microbiológico (micelio) sin llegar al desarrollo de cuerpos fructíferos (Gaitan y Bouchard, 2006) . (Gaitan, 2006, pp.7-12.

A diferencia de otros hongos de pudrición blanca, *P. ostreatus* no produce lignina peroxidasa, sino que su habilidad para degradar lignina está relacionada con su actividad lacasa y manganeso peroxidasa (Colquier G., 2008) La secreción de este tipo de enzimas le permite a *P. ostreatus* degradar una amplia gama de compuestos naturales y antropogénicos que presenten similitudes estructurales y químicas con la subestructura de la lignina como pesticidas, HAP, PCB, colorantes, entre otros. Varios estudios han expuesto las diferentes aplicaciones de *P. ostreatus* y sus enzimas en la desintoxicación de aguas residuales urbanas e industriales, biodegradación, biopulpación, degradación y desintoxicación de sustancias recalcitrantes (Ganash, M. Ghany, 2016). Por ejemplo, se ha reportado que *P. ostreatus* es capaz de degradar pentaclorofenol en un 78 – 90% presente en suelo mezclado con aserrín en un tiempo aproximado de 4 semanas (Quintero, Feijoo y Lema, 2006, pp.61-67).

1.7.1. Taxonomía

Pleurotus ostreatus se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera (Base de datos taxonómica de UniProt) (Colquier, G., 2008):

- **Dominio:** Eukaryota

- **Reino:** Fungi
- **Phyllum:** Basidiomycota
- **Clase:** Homobasidiomicetos
- **Orden:** Agaricales
- **Familia:** Pleurotaceae
- **Género:** *Pleurotus*
- **Especie:** *Pleurotus ostreatus*

1.7.2. Consideraciones para el cultivo de *Pleurotus ostreatus*

Solo las especies de *Pleurotus* (el género más usado para la producción de hongos comestibles) poseen un requerimiento de temperatura moderado tanto para su crecimiento como para la producción de enzimas (Tabla 4-1) y, en comparación a otras especies de hongos, son menos afectados por los organismos nativos del suelo (Sanchez y Royse, 2017: p.115-120).

Tabla 4-1. Parámetros por considerarse para el cultivo de *Pleurotus ostreatus*

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 relativa	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)

Fuente: (Sanchez y Royse, 2001)

Realizado por: Minta, Jessica, 2020.

El cultivo de *P. ostreatus* requiere un rango de temperatura entre 20 a 28°C, siendo la temperatura óptima de 25 °C. 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 (Sanchez y Royse, 2001).

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 y Royse, 2001).

Para el futuro se requiere una selección de especies de hongos con una capacidad competitiva tanto natural como obtenidas mediante ingeniería genética. 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 (Sanchez y Royse, 2001).

1.7.3. Aplicación de *Pleurotus ostreatus* en métodos de biorremediación

En la última década se han realizado estudios para probar la degradación de diversos hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) por el hongo *P. 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 *P. ostreatus*, pero no fue mineralizado (Marquez et al. 2000, pp. 108-115) (Marquez et al., 2000: pp. 108 - 115).

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 et al. 2003, pp.692-698).

En otra investigación, 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), estas 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, pp.03-4).

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 25 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 sí 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 (Deley, A., 2010, pp. 16-55).

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 ancenaftreno 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 et al., 2011, pp.5146-5149).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Zona de estudio

El presente estudio se realizó en la comunidad Sagrado Corazón de Jesús perteneciente a la parroquia San Luis, Cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo.

2.1.1. Lugar de la investigación

La fase de campo correspondiente a la recolección de muestras de suelo se efectuó en un cultivo de tomate riñón bajo invernadero localizado en la comunidad Sagrado Corazón de Jesús.

La fase de laboratorio se ejecutó en los laboratorios de la carrera de Biotecnología Ambiental de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Adicionalmente para determinar la concentración de clorpirifos en el suelo, las muestras fueron analizadas en el Centro de Soluciones Analíticas Integrales CENTROCESAL Cía. Ltda. De la ciudad de Quito.

2.2. Tipo de investigación

El presente trabajo investigativo es de tipo cuantitativo ya que se determinó la concentración de clorpirifos en las muestras de suelo antes y después de la aplicación de *Pleurotus ostreatus*.

- Según el tipo de inferencia es deductivo porque se parte de la premisa general de que *Pleurotus ostreatus* tiene capacidad de degradar de compuestos xenobióticos.
- Según el periodo temporal es de tipo transversal ya que se realizará en un lapso corto de tiempo, en lo que concierne a la toma de muestras de suelo e implementación del proceso de biodegradación.
- Según el nivel de profundización en el objeto de estudio es explicativa, ya que se determinará si la adición de un sustrato influye en el porcentaje de degradación de clorpirifos por parte del hongo.

2.2.1. Identificación de variables e Hipótesis

2.2.1.1. Variables

Variable dependiente

- Concentración de clorpirifos en el suelo

Variable independiente

- *Pleurotus ostreatus*
- Sustratos de crecimiento (trigo y cebada)
- pH
- Humedad
- Temperatura

2.2.1.2. Hipótesis

Hipótesis Alternante

Pleurotus ostreatus degrada los clorpirifos presentes en los suelos contaminados con plaguicidas organofosforados.

Hipótesis Nula

Pleurotus ostreatus no degrada los clorpirifos presentes en los suelos contaminados con plaguicidas organofosforados.

2.2.2. Diseño Experimental

2.2.2.1. Tipo de diseño

Mediante un DCA (Diseño completamente al azar) se evaluó la capacidad de biodegradación de clorpirifos presente en suelos contaminados por acción de *Pleurotus ostreatus* solo y con dos sustratos de crecimiento adicionales (trigo y cebada). Además, se determinó si la adición de un sustrato influye en el porcentaje de degradación de clorpirifos por parte del hongo.

En la tabla 1-2 se esquematiza las condiciones de cada tratamiento a ser implementado

Tabla 1-2. Diseño Experimental

Tratamiento	r1	r2	r3
T1	T1r1	T1r2	T1r3
T2	T2r1	T2r2	T2r3
T3	T3r1	T3r2	T3r3

Elaborado por: Minta, Jessica, 2019.

Tratamientos/ Nomenclatura = T

- T1 = *Pleurotus ostreatus* + suelo
- T2 = *Pleurotus ostreatus* + cebada + suelo
- T3 = *Pleurotus ostreatus* + trigo + suelo

Repeticiones / Nomenclatura = r - Se realizará un total de tres repeticiones

El DCA se analizará con un análisis de varianza (ADEVA), de existir diferencias significativas se implementará la prueba de Tukey para la separación de medias.

2.2.3. Esquema del proceso

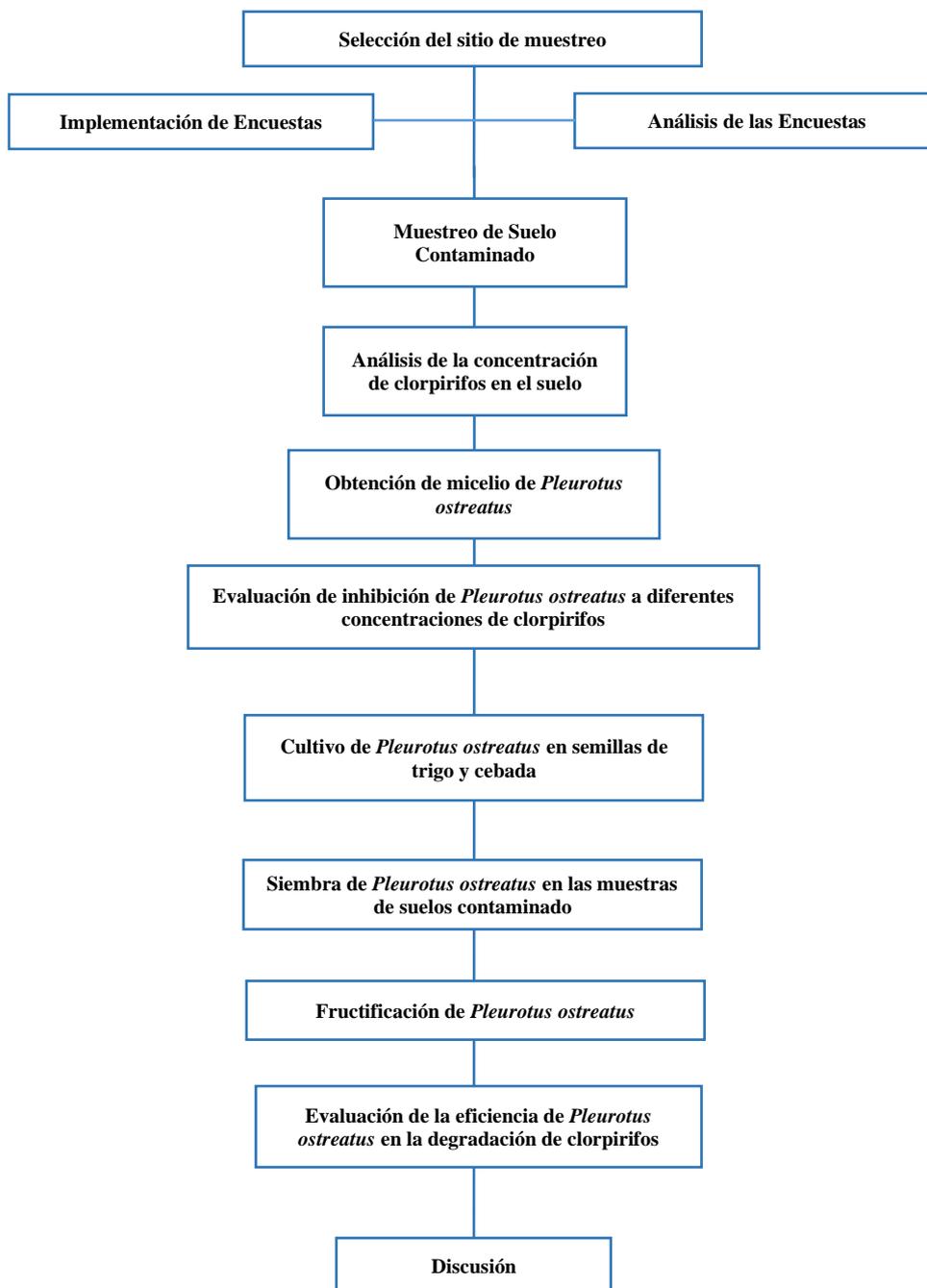


Gráfico 1-2. Esquema del proceso

Elaborado por: Minta, Jessica, 2019.

2.2.4. Marco metodológico

2.2.4.1. Selección del sitio de muestreo

Para la selección del sitio de muestreo se tomó como referencia los datos registrados en el Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial (PDOT) del GAD parroquial Rural de San Luis del año 2016. En dicho documento se establece que la comunidad Sagrado Corazón de Jesús y la Cabecera parroquial son las comunidades con mayor producción de tomate riñón bajo invernadero.

Se seleccionó a la comunidad Sagrado Corazón de Jesús para encuestar a los agricultores del sector con la finalidad de determinar el número de personas con cultivos de tomate riñón bajo invernadero y cuyo plaguicida de uso fuese Lorsban (Ingrediente activo - Clorpirifos). El formato de encuesta utilizado se muestra en el anexo 1.

Se realizó un total de 53 encuestas a los agricultores de la zona (Figura 1-2). El criterio de selección del sitio de muestreo fue que el agricultor contara con cultivos de tomate riñón bajo invernadero y que utilizara el plaguicida Lorsban cada siete días.



Figura 1-2. Elaboración de encuestas a los agricultores de la comunidad Sagrado Corazón

Elaborado por: Minta, Jessica, 2019.

2.2.4.2. Muestreo del suelo contaminado

Con el fin de obtener una muestra representativa de suelo se utilizó la metodología propuesta por el Instituto Nacional Autónomo de Investigación Agropecuaria – INIAP.

Se tomó un total de 15 muestras de aproximadamente dos kg repartidas en toda el área del invernadero seleccionado, para esto se utilizó un recorrido en zigzag que permitió abarcar de manera uniforme la totalidad del terreno. Las muestras fueron extraídas con la ayuda de una pala de desfonde realizando un hoyo en forma de “V” de 20 cm de profundidad, de una de las paredes del hoyo se tomó una porción de aproximadamente cinco cm de espesor y con un cuchillo se retiró los extremos (Figura 2-2).



Figura 2-2. Toma de muestras de suelo en el cultivo de tomate bajo invernadero.

Elaborado por: Minta, Jessica, 2019.

Cada una de las muestras fue depositada en un saco de yute para la obtención de una muestra general, misma que fue homogenizada con ayuda de la pala de desfonde al finalizar la recolección (INIAP, 2006, pp.79-87).

Las herramientas utilizadas fueron previamente desinfectadas con alcohol al 70% para así evitar la influencia de otras sustancias en el análisis de laboratorio.

Para el análisis inicial de la concentración de clorpirifos en el suelo se tomó un kg de suelo de la muestra general y se colocó en una funda hermética estéril para su posterior envío. Finalmente, la muestra general se situó en recipientes estériles para la subsiguiente implementación de los tratamientos planteados.

2.2.4.3. Análisis de la concentración de clorpirifos en el suelo

La concentración de clorpirifos en el suelo tanto de la muestra inicial como de las muestras al finalizar la implementación del experimento se realizó en los laboratorios del Centro de Soluciones Analíticas Integrales CENTROCESAL Cía. Ltda. de la ciudad de Quito, utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

2.2.4.4. Obtención de micelio de *Pleurotus ostreatus*

El micelio de *P. ostreatus* se obtuvo a partir de una cepa previamente aislada y conservada en el Laboratorio de Análisis Bioquímicos y Bacteriológicos de la Facultad de Ciencias.

Para la obtención del micelio se utilizó el medio de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA), el cual se esterilizó en conjunto con las cajas Petri de vidrio (15) a 121 °C durante 15 min bajo una presión de 15 psi. Finalizado el proceso de esterilización se dejó enfriar el medio de cultivo hasta una temperatura aproximada de 40 °C, se procedió a verterlo en las cajas Petri de vidrio y se dejó solidificar (Figura 3-2) (Suarez, R., 2013)

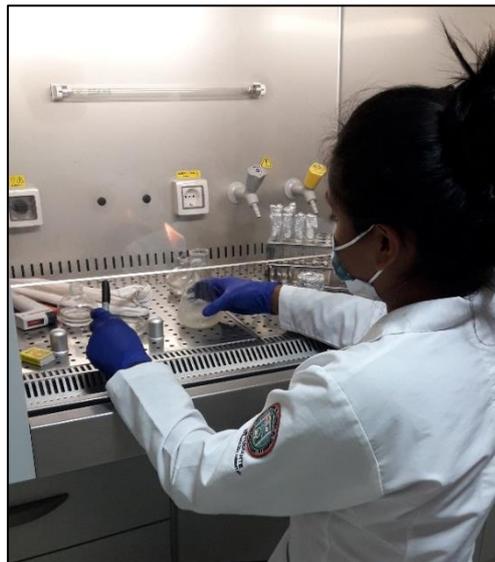


Figura 3-2. Preparación de medio de cultivo (PDA) para la siembra de *P. ostreatus*

Elaborado por: Minta, J. (2019)

Con un asa de siembra esterilizada a flama directa se cortó porciones de agar con micelio de la cepa original de aproximadamente 5 mm de lado y se sembró una porción en cada cuadrante de las cajas con el medio de cultivo previamente preparado. Finalmente, las cajas fueron incubadas a una temperatura de 28 °C hasta que el micelio abarque completamente la superficie del agar (Fotografía 4-2). Durante el periodo de incubación se examinaron periódicamente las cajas para descartar el crecimiento de algún tipo de contaminación (Suarez, R., 2013).



Figura 4-2. Incubación de *P. ostreatus* en medio PDA a 28°C.

Elaborado por: Minta, J. (2019)

2.2.4.5. Evaluación de inhibición de *Pleurotus ostreatus* a diferentes concentraciones de clorpirifos

Se realizó ensayos de inhibición del crecimiento de *P. ostreatus* en cajas Petri con medio de cultivo PDA a seis concentraciones de clorpirifos con dos repeticiones para cada una, juntamente con un cultivo de control (Sin clorpirifos). En cada caja se colocó 22 mL de medio PDA, una vez que este se haya solidificado se incorporó 10 mL de agua destilada estéril con concentraciones de 200, 100, 50, 10, 0.5 y 0.1 mL/L y una porción cuadrática de 5 mm por lado de micelio en el centro de la placa. El micelio fue sembrado utilizando un asa de siembra esterilizada a flama directa (Fotografía 5-2) (Lopera, Peñuela, Gustavo Domínguez y Mejía, 2005, pp.58-69).

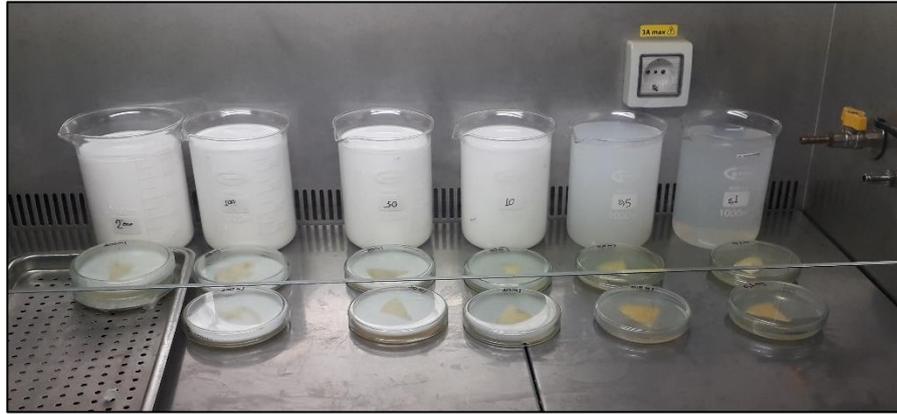


Figura 5-2. Siembra de *P. ostreatus* en medio PDA a diferentes concentraciones de clorpirifos.

Elaborado por: Minta, Jessica, 2019.

Las cajas fueron incubadas por ocho días a una temperatura de 28°C. Terminado el periodo de incubación se evaluó visualmente el crecimiento del hongo a las distintas concentraciones del plaguicida (Lopera, Peñuela, Gustavo Domínguez y Mejía, 2005, pp.58-69).

2.2.4.6. *Elaboración del inoculo de Pleurotus ostreatus en semillas de trigo y cebada*

Para el cultivo de *P. ostreatus* en semillas de trigo y cebada se siguió el procedimiento descrito por Barba y López (2017, p.21). Se limpió las semillas de trigo y cebada por medio de enjuagues continuos con agua para eliminar impurezas o granos infectados, así como desechos vegetales producto de su recolección. Posteriormente se sumergió las semillas en agua por una noche, finalizado el periodo de hidratación se escurrió el exceso de agua.

Las semillas fueron colocadas en frascos de vidrio de boca ancha de un litro de capacidad desinfectados con alcohol al 70%, se llenaron los frascos dos terceras partes de su capacidad y se fueron sellados con papel aluminio y una liga para ser esterilizados a 121 °C durante 45 min bajo una presión de 15 psi (Fotografía 6-2).



Figura 6-2. Preparación y esterilización de semillas de trigo y cebada.

Elaborado por: Minta, Jessica, 2019.

Finalizado el proceso de esterilización se dejó enfriar los frascos a temperatura ambiente previo a la inoculación del hongo. Para lo cual se cortó secciones de aproximadamente un cm de lado de micelio con agar utilizando un asa de siembra esterilizada a flama directa de los cultivos previamente realizados.

En cada frasco se colocó ocho secciones sobre la superficie de las semillas, una vez sellados los frascos se procedió a agitar cuidadosamente para poder dispersar las secciones de micelio (Fotografía 7-2). Finalmente, los frascos fueron incubados en oscuridad a una temperatura de 28 °C por 15 días o hasta que el micelio haya cubierto totalmente los sustratos.



Figura 7-2. Siembra de *P. ostreatus* en semillas de trigo y cebada.

Elaborado por: Minta, Jessica, 2019.

2.2.4.7. Siembra de *Pleurotus ostreatus* en las muestras de suelo

Para la implementación del experimento se colocaron tres kg de suelo proveniente de la muestra general en recipientes de plástico previamente desinfectados con alcohol al 70%. La siembra *P. ostreatus* se realizó en cada uno de los recipientes una sola vez durante todo el experimento. Se suministró 30 g de hongo colonizado en semillas de trigo, cebada o en suspensión por cada kg de suelo evaluado (Fernández, F, 2004, p.54). Por lo que cada tratamiento recibirá 90 g de inóculo.

El primer tratamiento fue inoculado con una suspensión del micelio del hongo, por lo tanto, se procedió a recortar discos de micelio de cinco cm de diámetro utilizando un bisturí estéril. Se evitó tomar agar al momento de remover el micelio y se recortó discos hasta alcanzar un peso de 50 g.

El micelio fue homogenizado con 40 mL de agua estéril con ayuda de una licuadora previamente desinfectada con alcohol al 70% y enjuagada con agua estéril (Fotografía 8-2) (Cabezas, K., 2014, pp.43-44). Finalmente se colocó la suspensión en el suelo y fue homogenizada manualmente.



Figura 8-2. Preparación de la suspensión de *P. ostreatus* para su posterior siembra en el primer tratamiento.

Elaborado por: Minta, Jessica, 2019.

En el caso de los tratamientos dos y tres, se colocó en el suelo 90 g de semillas de trigo y cebada colonizadas con *P. ostreatus* en las muestras de suelo correspondiente a cada tratamiento. A continuación, se homogenizó las semillas en el suelo con ayuda de una espátula estéril (Fotografía 9-2).



Figura 9-2. Siembra y homogenización de semillas de trigo colonizadas con *P. ostreatus*.

Elaborado por: Minta, Jessica, 2019.

2.2.4.8. Fructificación de *Pleurotus ostreatus*

La fructificación de *P. ostreatus* constó de dos etapas. Primera etapa: Inicialmente todos los tratamientos fueron recubiertos con bolsas plásticas de color negro y se las incubó en un lugar oscuro a temperatura ambiente, hasta que se observó colonización del suelo. Esta etapa tuvo una duración de 15 días (Fotografía 10-2).



Figura 10-2. Incubación de los tratamientos en oscuridad (Primera etapa).

Elaborado por: Minta, Jessica, 2019.

Segunda etapa: Posteriormente se retiró las fundas plásticas y los tratamientos fueron expuestos a periodos de 12 horas de luz por aproximadamente hasta la formación de carpóforos. Durante todo el proceso se mantuvo el suelo húmedo para lo tanto se roció agua a los tratamientos de forma periódica (Fernández, F, 2004, p.54).

2.2.3.1.8. Evaluación de la eficiencia de *Pleurotus ostreatus* en la degradación de clorpirifos

El porcentaje de degradación de clorpirifos por acción de *P. ostreatus* se calculó al comparar la concentración inicial y final del plaguicida en los diferentes tratamientos utilizando la ecuación descrita por Monge et al. (2009, pp.24-47).

$$\% \text{ de degradación de clorpirifos} = \frac{[\text{Clorpirifos}]_o - [\text{Clorpirifos}]_f}{[\text{Clorpirifos}]_o} \times 100$$

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Tabulación y análisis de las encuestas realizadas a agricultores de la comunidad Sagrado Corazón de Jesús para la selección del sitio de muestreo.

De las encuestas realizadas a 53 personas (Anexo 1) pertenecientes a la comunidad Sagrado Corazón de Jesús se determinó que el 35% (39) de las personas cultivaban tomate riñón convirtiéndose en el cultivo predominante de la zona, seguido por los cultivos de pimiento (29; 26%), pepinillo (23; 21%) y tomate de árbol (16; 15%) (Gráfico 1-3). Cabe destacar que, en ciertos casos las personas poseían dos o tres de los cultivos mencionados.



Gráfico 1-3. Resultados obtenidos de la primera pregunta de la encuesta realizada a los agricultores de la comunidad Sagrado Corazón de Jesús.

Elaborado por: Minta, Jessica, 2019.

Los resultados de la segunda pregunta evidencian que de las 53 personas encuestadas el 62% (33) utiliza actualmente el plaguicida Lorsban y el 38% (20) no lo utiliza actualmente (Gráfico 2-3).

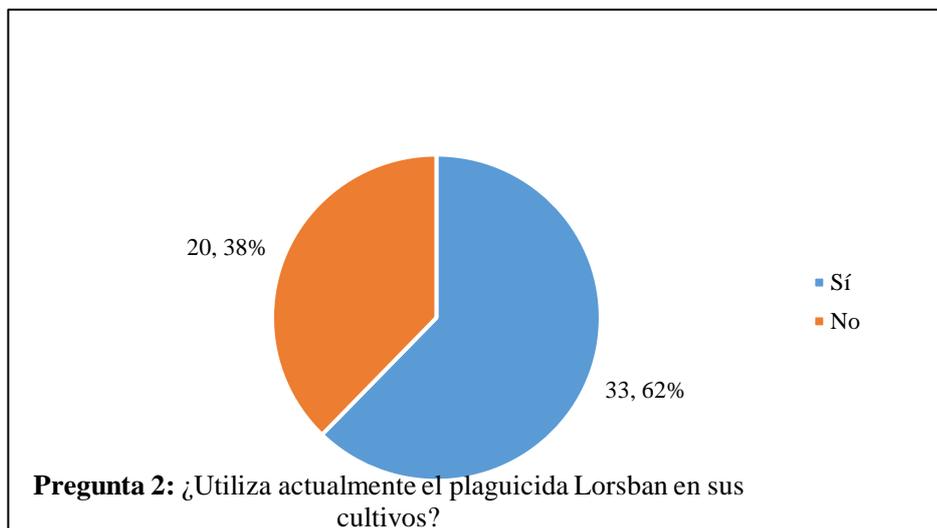


Gráfico 2-3. Resultados obtenidos de la segunda pregunta de la encuesta realizada a los agricultores de la comunidad Sagrado Corazón de Jesús.

Elaborado por: Minta, Jessica, 2019.

La pregunta tres sólo contestaron las personas que respondieron “Sí” en el apartado anterior, por lo tanto, la población total se redujo a 33 personas. Con respecto a la frecuencia de aplicación del plaguicida Lorsban en los cultivos se estableció que el 58% (19) de las personas la utiliza cada 15 días, el 24% (8) lo utiliza cada siete días, y el 18% (6) cada 21 días (Gráfico 3-3). Siendo esta última la frecuencia de aplicación recomendada para este tipo de plaguicida.

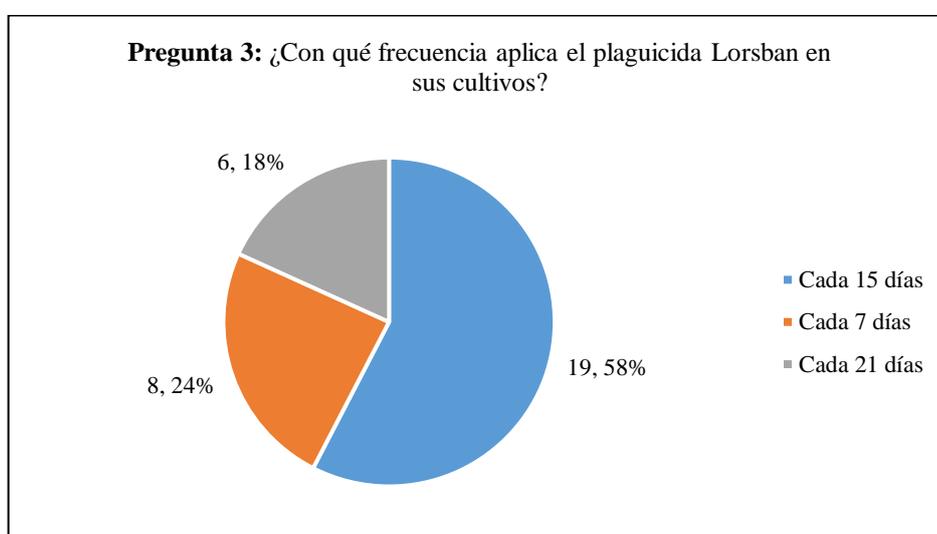


Gráfico 3-3. Resultados obtenidos de la tercera pregunta de la encuesta realizada a los agricultores de la comunidad Sagrado Corazón de Jesús.

Elaborado por: Minta, Jessica, 2019.

En base a los resultados obtenidos se determinó el sitio de muestro adecuado fue aquel que cumpla con el siguiente criterio de selección. Los invernaderos que se consideraron elegibles fueron aquellos cuyo cultivo fuera de tomate riñón y utilizar el plaguicida Lorsban cada siete días. Considerando lo ya mencionado, solo 5 invernaderos resultaron elegibles, siendo elegido el invernadero perteneciente a la señora Ana Pinduizaca debido a la apertura y facilidades brindadas para el muestreo del suelo.

3.2. Obtención de micelio de *Pleurotus ostreatus*

El micelio de *P. ostreatus* sembrado en medio PDA se caracterizó por presentar una coloración blanca, textura ligeramente algodonosa, baja densidad y escaso crecimiento, durante los primeros cuatro días de incubación. Durante este periodo se descartó la contaminación del cultivo al no observar la presencia de bacterias u otros hongos en el medio de cultivo (Fotografía 1-3).



Figura 1-3. Micelio de *P. ostreatus* al cuarto día posterior a la siembra.

Elaborado por: Minta, Jessica, 2019.

Doce días después de la siembra el micelio colonizó completamente el medio de cultivo, en esta instancia el hongo mantuvo su coloración blanca, su crecimiento fue abundante con una textura visiblemente algodonosa y de alta densidad (Figura 2-3).

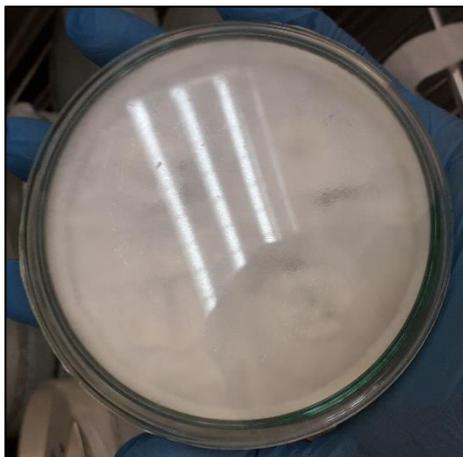


Figura 2-3. Micelio de *P. ostreatus* al doceavo día posterior a la siembra.

Elaborado por: Minta, Jessica, 2019.

Los datos obtenidos concuerdan con los reportados por Maftoun et al. (2017, pp. 106-110) quien igualmente observó crecimiento total de *P. ostreatus* en medio PDA después de 12 días de cultivo, el micelio se caracterizó por presentar un color blanco y una textura algodonosa. Hoa y Wang (2015) señalan en su investigación que el crecimiento máximo y de mayor densidad de micelio de *P. ostreatus* en medio PDA se logra al cultivarlo a una temperatura óptima de 28°C, asemejándose a los resultados registrados en laboratorio donde se manejaron las mismas condiciones de cultivo.

3.3. Evaluación de inhibición de *Pleurotus ostreatus* a diferentes concentraciones de clorpirifos

En las pruebas de inhibición se evidenció que, a los siete días posteriores a la siembra el cultivo control invadió un 95% el medio, el micelio presentaba una textura algodonosa y densidad ligeramente alta, este comportamiento fue similar en los cultivos que contenían clorpirifos a concentraciones de 0.1 y 0.5 mL/L. Mientras que los cultivos con clorpirifos a concentraciones de 10 y 50 mL/L presentaron un micelio con textura ligeramente algodonosa, densidad y crecimiento regular. En contraste los cultivos con concentraciones de 100 y 200 mL/L con el mismo tiempo de siembra que los cultivos anteriores exhibieron una textura ligeramente algodonosa, densidad y crecimiento escaso (Figura 3-3).



Figura 3-3. Cultivo de siete días de *P. ostreatus* - control (Izq.) y con clorpirifos al 50 mL/L (Med.) y 200 mL/L (Der.).

Elaborado por: Minta, Jessica, 2019.

La tendencia mostrada en los primeros siete días de cultivo por los tratamientos con clorpirifos a concentraciones de 10 y 50 mL/L se mantuvo hasta el día 18 posterior a la siembra. Después de este periodo de tiempo el micelio invadió completamente el medio de cultivo, su textura se tornó algodonosa y presentaron una densidad ligeramente alta. En cuanto a los cultivos con concentraciones de 100 y 200 mL/L de igual manera a los 18 días posteriores a la siembra invadieron completamente el medio. Sin embargo, se observó dos tipos de texturas, el centro presentó una textura algodonosa y mientras que avanzaba hacia los bordes la textura se tornaba ligeramente algodonosa (Figura 4-3).



Figura 4-3. Cultivo de 18 días de *P. ostreatus* con clorpirifos a 50 (Izq.) y 200 (Der.) mL/L.

Elaborado por: Minta, Jessica, 2019

El tratamiento control y los tratamientos con clorpirifos a 0.1 y 0.5 mL/L invadieron completamente el medio a los 13 días, su textura era completamente algodonosa y de alta densidad. Si bien la adición de concentraciones medias y altas de clorpirifos al medio de cultivo no inhibió el crecimiento de *P. ostreatus*, estas pueden ralentizar su crecimiento y desarrollo.

Los resultados obtenidos concuerdan con pruebas de tolerancia realizadas por Stamatiu et al. (2015: pp.52-55) a *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* y algunas especies de *Trichoderma* para clorpirifos en condiciones *in vitro*, en las que el contaminante no inhibió el crecimiento micelial, simplemente retrasó su desarrollo y las cepas exhibieron una recuperación paulatina conforme transcurrían los días de cultivo. Asimismo, Gouma et al. (2019) demostró que *P. ostreatus* tiene tolerancia a diferentes concentraciones de plomo, ya que el crecimiento de su micelio no presentó diferencias significativas en relación con el crecimiento control, alcanzando su misma textura y densidad.

3.4. Cultivo de *Pleurotus ostreatus* en semillas de trigo y cebada

Las semillas de trigo y cebada fueron colonizadas completamente por el micelio de *P. ostreatus* 14 días posterior a su siembra (Fotografía 5-3). El tiempo registrado concuerda con lo señalado por Karas, Perruchon y Karpouzias (2011) quienes determinan que el tiempo aproximado para que el micelio cubra totalmente las semillas (trigo, sorgo, maíz, cebada) es de dos a tres semanas, además mencionan que dicho tiempo puede variar en función de la humedad y temperatura del sitio de incubación. Lo anteriormente mencionado se refleja en el estudio realizado por Wali et al. (2020) quien obtuvo una propagación completa del micelio *P. ostreatus* en semillas de cebada luego de aproximadamente 20 días.



Figura 5-3. Crecimiento de micelio de *P. ostreatus* en semillas de trigo y cebada.

Elaborado por: Minta, Jessica, 2019.

3.5. Fructificación de *Pleurotus ostreatus* en suelo contaminado con clorpirifos

3.5.1. Crecimiento durante la primera etapa de fructificación

En el primer tratamiento (*P. ostreatus* en suspensión + suelo) se observó un crecimiento interno escaso de micelio en el suelo. Solo en la primera repetición se pudo observar un crecimiento sutil de micelio en la superficie, en las repeticiones dos y tres no se observó presencia de micelio en la superficie. El periodo de incubación finalizó en el veintavo día, al no existir cambios significativos en el crecimiento micelial (Fotografía 6-3).



Figura 6-3. Crecimiento de micelio de *P. ostreatus* después de 15 días de incubación en oscuridad.

Elaborado por: Minta, Jessica, 2019.

El tratamiento dos (*P. ostreatus* + cebada + suelo) presentó crecimiento abundante de micelio tanto en la parte superior como en el interior del suelo en todas sus repeticiones. En la parte superficial el micelio se caracterizó por su coloración blanquecina de textura algodonosa, mientras que en el interior del suelo el micelio se asemejaba a una malla entretrejida.

En el tratamiento tres (*P. ostreatus* + trigo + suelo) el micelio exhibió las mismas características que en el tratamiento dos, pero su crecimiento fue notoriamente mayor, a excepción de la

repetición tres cuyo crecimiento fue similar al tratamiento dos. Como se observa en la Fotografía 6-3 la superficie del suelo del tratamiento tres en sus repeticiones uno y dos presentó mayor crecimiento de micelio al compararlo con el tratamiento dos. La primera etapa finalizó para los dos tratamientos el día 17 posterior a la siembra al no existir cambios significativos en el crecimiento de micelio.

Los periodos de colonización registrados en los tratamientos implementados están en concordancia con los reportados por Tobar, L. (2018, p.31) quien evaluó la eficiencia de *P. ostreatus* para degradar carbaryl en el suelo. En dicha investigación el micelio sin un sustrato adicional invadió el suelo a los 19 días de incubación en oscuridad y en compañía de semillas de avena y trigo la colonización completa del suelo fue a los 17 y 15 días, respectivamente. Cabe destacar que la mayor invasión de micelio en el suelo igualmente se presentó en el ensayo con semillas de trigo.

3.5.2. Crecimiento durante la segunda etapa de fructificación

El primer tratamiento (*P. ostreatus* en suspensión + suelo) mostró la generación de primordios diez días después de estar expuestos a 12 horas de luz diaria. Nueve días después los primordios aumentaron ligeramente su tamaño, no obstante, no generaron cuerpos fructíferos. Se finalizó el ensayo cuatro días después al observar que los primordios no presentaron cambios (Fotografía 7-3).



Figura 7-3. Presencia de primordios en el tratamiento uno, diez días después de iniciada la segunda etapa de fructificación.

Elaborado por: Minta, Jessica, 2019.

En el segundo tratamiento (*P. ostreatus* + cebada + suelo) los primordios aparecieron siete días después del inicio de la segunda etapa. La formación de cuerpos fructíferos surgió cuatro días más tarde, donde se observó pequeños sombreros de color blanquecino, aplanados con forma de ostra y margen enrollado (Fotografía 8-3). Tres días después los cuerpos fructíferos no aumentaron de tamaño ni mostraron cambios significativos en su estructura, por lo que se finalizó la etapa.



Figura 8-3. Cuerpos fructíferos en el tratamiento dos, 11 días después de iniciada la segunda etapa de fructificación.

Elaborado por: Minta, Jessica, 2019.

Finalmente, en el tercer tratamiento (*P. ostreatus* + trigo + suelo) los primordios se desarrollaron cinco días después de iniciada la segunda etapa y los cuerpos fructíferos se formaron tres días más tarde. Los cuerpos fructíferos presentaron las mismas características estructurales mencionadas para el tratamiento dos, pero el tamaño del sombrero del cuerpo fructífero fue visualmente mayor en el tratamiento tres. La etapa finalizó tres días después al no observar cambios en los cuerpos fructíferos (Fotografía 9-3). Cabe recalcar que el tiempo de aparición de primordios y formación de cuerpos fructíferos fue menor para el tratamiento tres en comparación con los registrados para el tratamiento dos.



Figura 9-3. Formación de cuerpos fructíferos en el tratamiento tres, ocho días después de iniciada la segunda etapa de fructificación.

Elaborado por: Minta, Jessica, 2019.

Al comparar el tiempo de fructificación de cada tratamiento con los obtenidos por Tobar, L. (2018, p.31-34) se determinó las siguientes similitudes. La formación de primordios y cuerpos fructíferos fue notoriamente más rápida al utilizar sustratos adicionales, Tobar, L. (2018) registró formación de primordios a los nueve y ocho días posterior a la exposición a luz solar y cuerpos fructíferos siete y cinco días después, para avena y trigo respectivamente. Mientras que el micelio sin sustrato adicional generó primordios a los 12 días y cuerpos fructíferos luego de nueve días. Además, el ensayo con semillas de trigo exhibió cuerpos fructíferos de mayor tamaño, característica análoga a la presentada en el tratamiento tres.

Investigaciones como la realizada por Simbaña (2016, pp. 51-60) ratifican la capacidad de *P. ostreatus* para adaptarse y desarrollarse en suelos con presencia de sustancias xenobióticas. Simbaña consiguió la fructificación de *P. ostreatus* en un periodo de seis semanas en suelo contaminado con hidrocarburos, el mismo que fue acondicionado con cáscara de arveja, bagazo de caña y cacao para favorecer la propagación del micelio. Ratificando los resultados obtenidos en el presente ensayo, donde *P. ostreatus* complementado con semillas de trigo y cebada fructificó en suelo contaminado con clorpirifos, aproximadamente a las cuatro semanas de la inoculación en el suelo.

3.6. Evaluación de la eficiencia de *Pleurotus ostreatus* en la degradación de clorpirifos

La muestra general de suelo registró una concentración inicial de clorpirifos de 380 ppm, finalizado el proceso de fructificación en cada uno de los tratamientos se analizó las muestras de suelo para determinar la concentración final de clorpirifos. La tabla 1-3 detalla la concentración final de clorpirifos en el suelo luego de la adición de *P. ostreatus*.

Tabla 1-3. Concentración final de clorpirifos en cada tratamiento.

Tratamiento	Repetición	Concentración inicial (ppm)	Concentración final (ppm)	Concentración final promedio (ppm)
T1	r1	380	210	210.33
	r2		212	
	r3		209	
T2	r1	380	140	139.67
	r2		138	
	r3		141	
T3	r1	380	129	128.33
	r2		130	
	r3		126	

Elaborado por: Minta, Jessica, 2019.

En el Gráfico 5-3 se observa la reducción de la concentración de clorpirifos en cada uno de los tratamientos, evidenciando así la degradación de clorpirifos por acción de *P. ostreatus*. El tratamiento que presentó la menor concentración final de clorpirifos fue el tratamiento tres (*P. ostreatus* + trigo + suelo) con 128.33 ppm, seguido del tratamiento dos, (*P. ostreatus* + cebada + suelo) con 139.67 ppm y finalmente el tratamiento uno (*P. ostreatus* en suspensión + suelo) con 210.33 ppm. Se debe destacar que existió una diferencia notoria en la concentración final de clorpirifos cuando el hongo se encontraba acompañado de un sustrato de crecimiento adicional, que al encontrarse solo.

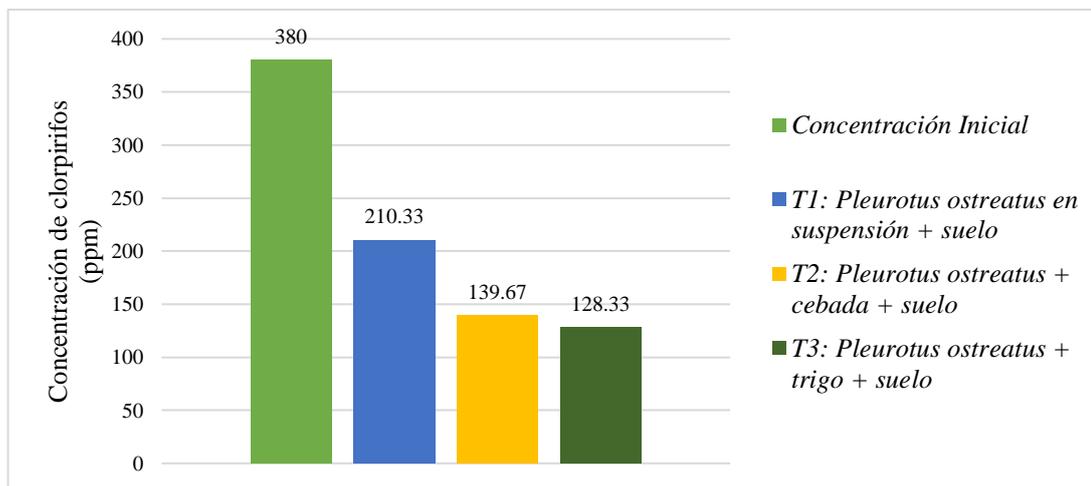


Gráfico 4-3. Comparación del promedio de la concentración final de clorpirifos de cada tratamiento con la concentración inicial presente en el suelo.

Elaborado por: Minta, Jessica, 2019.

Finalmente, se procedió a valorar la capacidad de degradación de clorpirifos por parte de *P. ostreatus*. Se calculó el porcentaje de degradación para cada tratamiento en función de la concentración inicial y final de clorpirifos (Tabla 2-3). Con los resultados obtenidos en esta sección se realizó un análisis de varianza (ADEVA) para determinar si existió o no diferencia significativas entre los tratamientos, en el caso del primer escenario se implementó una prueba de Tukey para la separación de medias.

Tabla 2-3. Porcentaje de degradación de clorpirifos en cada tratamiento.

Tratamiento	Repetición	Concentración inicial (ppm)	Concentración Final (ppm)	Porcentaje de degradación	Porcentaje de degradación Promedio
T1	r1	380	210	44.74%	44.65%
	r2		212	44.21%	
	r3		209	45.00%	
T2	r1	380	140	63.16%	63.25%
	r2		138	63.68%	
	r3		141	62.89%	
T3	r1	380	129	66.05%	66.23%
	r2		130	65.79%	
	r3		126	66.84%	

Elaborado por: Minta, Jessica, 2019

Como se observa en el Gráfico 6-3 el tratamiento dos (*P. ostreatus* + cebada + suelo) y tres (*P. ostreatus* + trigo + suelo) obtuvieron los mayores porcentajes de degradación, 63.25% y 66.23% respectivamente. El tratamiento uno (*P. ostreatus* en suspensión + suelo) consiguió una tasa de degradación de 44.65%, siendo visiblemente menor en contraste con los otros tratamientos.

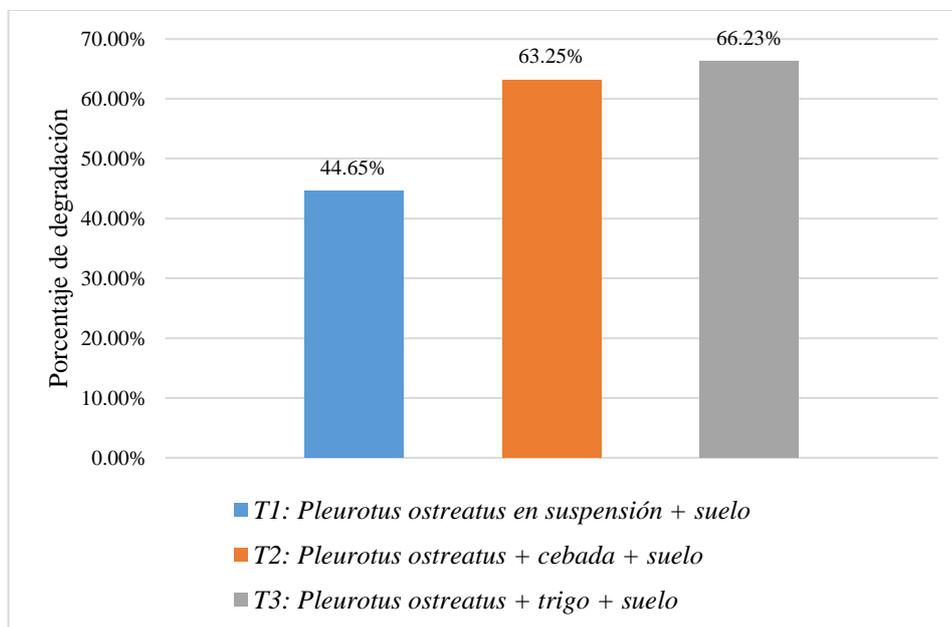


Gráfico 5-3. Comparación de los porcentajes de degradación promedio obtenidos en cada tratamiento.

Elaborado por: Minta, Jessica, 2019.

La diferencia de crecimiento y degradación entre el tratamiento uno con los tratamientos dos y tres, responde a que los hongos de pudrición blanca utilizan sustratos lignocelulósicos como fuente primaria de nutrientes, los cuales promueven el crecimiento y como resultado las hifas alcanzan una mayor extensión e invasión, incrementando así la degradación de los contaminantes presentes (Quintero, J. 2011, pp. 5867-5882).

Magan, N., (2007, pp.63-67) recalca que los mecanismos de biodegradación que utilizan los hongos de pudrición blanca transforman o mineralizan los contaminantes, sin utilizarlos como sustratos de crecimiento, por tanto, su degradación se da por cometabolismo. Se define como cometabolismo a la degradación concomitante de dos compuestos orgánicos (García y Peralta, 2008, pp. 2-12). En el caso del tratamiento uno al no existir una fuente de nutrientes lignocelulósica directa, *P. ostreatus* se desarrolló únicamente con los nutrientes presentes en el suelo por lo que su crecimiento y degradación de clorpirifos por cometabolismo fue limitada.

Los porcentajes de degradación obtenidos en cada tratamiento guardan relación con el estudio realizado por Supreeth y Raju (2017) quien alcanzó una degradación de clorpirifos del 59.54% en suelos de cultivo de papa mediante la aplicación de *P. ostreatus*. Adicionalmente logró obtener una degradación de clorpirifos del 66.80% al utilizar *P. ostreatus* junto con *Trichoderma harzianum*.

Diversas investigaciones han demostrado la capacidad de *P. ostreatus* de degradar compuestos xenobióticos, como la realizada por Kulshrestha y Kumari (2011) en la que *P. ostreatus* presentó la capacidad de degradar toxafeno en suelo, además se demostró que la adición de sustratos de crecimiento como cascarilla de arroz y aserrín generan una acción sinérgica con el hongo aumentando la degradación del contaminante hasta un 90%. También se puede citar al estudio realizado por Ganash y Ghany (2016 pp.1-6) quien ejecutó pruebas *in vitro* en las que *P. ostreatus* exhibió porcentajes de degradación de malatión de hasta 76.4%.

La Norma de Calidad Ambiental del Recurso Suelo y Criterios de remediación para suelos contaminados vigente en el país, no estipula un límite máximo permisible para pesticidas organofosforados o sus derivados para la remediación o restauración de suelo. El clorpirifos se hidroliza rápidamente en 3,5,6 – tricloro – 2 – 2 piridinol (TCP) que se caracteriza por ser más móvil que su molécula parental a causa de su mayor solubilidad en agua, generando contaminación extendida en agua y suelos. Por lo que la Agencia de Protección Ambiental de Los Estados Unidos la ha incluido en la lista de contaminantes persistentes. El TCP manifiesta gran actividad antimicrobiana, imposibilitando su degradación por acción de microorganismo, además de restringir la degradación de clorpirifos (Hernández, Álvarez y Ríos, 2017, pp139-159). Por esta razón es importante que se delimite y se controle el uso de este tipo de pesticidas a nivel agrícola, en función de su efecto en el ambiente.

3.7. Análisis estadístico

El análisis de varianza se llevó a cabo para determinar si existió diferencias significativas entre los tratamientos implementados, y poder aceptar o rechazar las hipótesis planteadas.

Hi: *Pleurotus ostreatus* degrada los clorpirifos presentes en los suelos contaminados con plaguicidas organofosforados.

Ho: *Pleurotus ostreatus* no degrada los clorpirifos presentes en los suelos contaminados con plaguicidas organofosforados.

En función a los resultados obtenidos en cada uno de los tratamientos se acepta la hipótesis alternante y se concluye que *P. ostreatus* tiene la capacidad de degradar los clorpirifos presentes en suelos contaminados con plaguicidas organofosforados. El *p* – valor obtenido (< 0.0001) del análisis de varianza fue menor a 0.05 en consecuencia, se estableció que existió diferencias significativas entre los porcentajes de degradación de los tratamientos (Tabla 3-3). Por lo tanto, se concluye que *P. ostreatus* incrementó su capacidad de biodegradar clorpirifos presente en suelo contaminado al añadir un sustrato de crecimiento.

Tabla 3-3. Análisis de varianza de los porcentajes de degradación de clorpirifos.

F. V	SC	GI	CM	F	p-valor
Modelo.	820.16	2	410.8	1976.72	< 0.0001
Tratamiento	820.16	2	410.8	1976.73	< 0.0001
Error	1.24	6	0.21		
Total	821.41	8			

Elaborado por: Minta, Jessica,2019.

Como último paso se realizó la prueba de Tukey para la separación de medias. Los tres tratamientos se clasificaron en tres grupos A, B y C, es así como se seleccionó al tratamiento tres (*P. ostreatus* + trigo + suelo) como aquel que presentó la mejor capacidad de biodegradar clorpirifos en suelo (Tabla 4-3).

Tabla 4-3. Prueba de Tukey para el porcentaje de degradación de clorpirifos.

Tratamiento	Medias	N	E. E			
T1	44.65	3	0.26	A		
T2	63.24	3	0.26		B	
T3	66.23	3	0.26			C

Elaborado por: Minta, Jessica,2019.

CONCLUSIONES

- El hongo *Pleurotus ostreatus* se desarrolló a altas concentraciones de clorpirifos (10, 50, 100 y 200 mL/L) en medio de cultivo PDA. El crecimiento de micelio mostró ralentización, más no inhibición, obteniendo un crecimiento similar a cultivos sin clorpirifos o a concentraciones bajas del mismo (0.1 y 0.5 mL/L), pero con más días de incubación.
- El *Pleurotus ostreatus* degradó clorpirifos presentes en suelo en una concentración inicial de 380 ppm a 210.33, 139.76 y 128.33 ppm para los tratamientos uno (*P. ostreatus* en suspensión + suelo), dos (*P. ostreatus* + cebada + suelo) y tres (*P. ostreatus* + trigo + suelo), respectivamente.
- El tratamiento que alcanzó la mayor tasa de degradación de clorpirifos fue el tratamiento tres (*P. ostreatus* + trigo + suelo) con 66.23%, seguido del tratamiento dos (*P. ostreatus* + cebada + suelo) con 63.25% y finalmente el tratamiento uno (*P. ostreatus* en suspensión + suelo) con 44.65%
- La diferencia en el porcentaje de degradación entre el tratamiento dos (*P. ostreatus* + cebada + suelo) y tres (*P. ostreatus* + trigo + suelo) con el tratamiento uno (*P. ostreatus* en suspensión + suelo), radica en que las semillas de trigo y cebada cumplen el rol de nutrientes primarios para el crecimiento del hongo, promoviendo su difusión en el suelo y por ende la degradación de clorpirifos por cometabolismo. Mediante análisis estadístico se determinó que el tratamiento que obtuvo el mejor porcentaje de degradación fue el tratamiento tres (*P. ostreatus* + trigo + suelo).

RECOMENDACIONES

- Realizar ensayos con diferentes microorganismos capaces de degradar otros compuestos contaminantes presentes en el suelo para analizar su interacción.
- Realizar ensayos con residuos agrícolas o forestales como viruta de madera, tusa de maíz o paja de trigo y comparar el porcentaje de degradación con los obtenidos en el presente ensayo.

GLOSARIO

Agar: Sustancia gelatinosa extraída de algunas algas, principalmente las rojas, utilizada como medio de cultivo neutro, debido a que proporciona los nutrientes necesarios para el desarrollo tanto de hongos como de bacterias. (Armisen y Galatas, 2009 ,p. 27)

Cepa: término usado en microbiología generalmente para referirse al “conjunto de células homogéneas, o clones, que deriva de la reproducción de una célula inicial única, seleccionada y aislada. También suele referirse a las cepas como colonias puras de bacterias”. (Rubiano Labrador, 2006, p. 36)

Cometabolismo: hace referencia a la transformación, por microorganismos, de un compuesto llamado cosustrato en presencia obligada de un sustrato durante el crecimiento o por células en reposo en ausencia del sustrato de crecimiento es parte fundamental de la eliminación biológica de compuestos xenobioticos en el ambiente. (García y Peralta, 2008, pp. 2-12)

Carpóforos: conocidos también como setas, son las fructificaciones de los hongos. Su apariencia puede ser globulosa, subglobulosa o turberiforme; con una base radicular o rizomorfa. Su principal función es desarrollar y dispersar las esporas del hongo. (Ardiles Huerta, Osorio-Zúñiga y Barrera Moscoso, 2009, p. 65)

Compuestos Btex: acrónimo que hace referencia a la unión de cuatro contaminantes que son: el Benceno, Tolueno, Etilbenceno, Xilenos. Son de gran importancia para el análisis de la calidad del aire, debido a recientes estudios que los han catalogado como cancerígenos. Se encuentran presentes en combustibles (petróleo y sus derivados,) y en químicos intermedios, como solventes para grasas, tintas, aceites, pinturas, plásticos, ente otros. (Garcia Zarate et al., 2015, pp. 6-7)

Hifas: filamentos cilíndricos que en su conjunto forman la estructura de los hongos. Cada hifa equivale a una célula o más células, además, se encuentra rodeada por una pared celular quitinosa y de forma tubular. (Gómez, C., 2012, pp. 78-79)

Incubación: en microbiología, se refiere a la implementación de las características (temperatura, humedad, cantidad de luz) necesarias para el desarrollo y crecimiento de un determinado microorganismo. (Morales, L., 2009, p. 98)

Inóculo: suspensión de esporas que con la ayuda de un vector (aire, agua, instrumentos de laboratorio) se transportan a otro organismo, medio o sustrato para reproducirse y desarrollarse. En el área de laboratorio a este proceso se lo denomina como inoculación. (Carrillo y Audisio , 2007, pp. 100-101)

Micelio: “estructura vegetativa que consta de una masa de citoplasma multinucleado encerrado dentro de un sistema de tubos rígidos y ramificados, denominados Hifas. Normalmente surgen de la germinación y posterior crecimiento de una sola célula reproductora o espora.”(Carrillo, L., 2003, p. 52)

Primordio: (*L.primus, primero, + ordiri, empezar a urdir*): órgano que se encuentra en estado de formación (Gómez, C., 2012, p. 56)

Ralentización: Disminución en los procesos metabólicos microbianos, por factores externos (temperatura, contaminación), internos (sustrato) o los dos. Esto produce un lento crecimiento, bajo desarrollo e incluso puede generar la interrupción total . (Morales, L., 2009, pp. 101-102)

BIBLIOGRAFÍA

ARDILES HUERTA, V., et al. "Briofitas sobre carpóforos de hongos" *Gayana. Botánica*, vol.43, no. 4 2009, pp. 14-24. DOI 10.4067/s0717-66432009000100008.

ARMISÉN, R. et al. *Handbook of Hydrocolloids: Second Edition*. Cambridge-Reino Unido: Cambridge UE, 2009. ISBN 9781845695873, pp. 90-112.

BARBA, J. et al. *Guía práctica para el cultivo de Setas*. Nuevo León-México: UAM-IBTG, 2017. [Consulta: 28 agosto 2020] Disponible en: <http://publicacionescbs.izt.uam.mx/DOCS/csetas.pdf>.

BLUE, R., et al. "Biodegradation of Remazol Brilliant by ligninolytic enzymatic complex produced by *Pleurotus ostreatus*". *Brazilian Journal of Microbiology*, 2006, vol. 25, pp. 468-473.

BODDY, L., et al., *Ecology of Saprotrophic Basidiomycetes*. Londres - Reino Unido : The British Mycological Society, 2008, p. 68.

BRADY, N.C. et al., "The Nature and Properties of Soils". *BaiduScholar*[en línea]. vol. 35, no. 145, 2012, pp73-98. [Consulta:12 Septiembre 2020] Disponible en: <http://www.cabdirect.org/abstracts/19961906536.html>

CABEZAS, K.,. Obtención de un extracto enzimático con actividad lacásica por fermentación líquida del hongo *Pleurotus ostreatus* en un medio con bagazo de maíz a escala laboratorio para decoloración de colorantes textiles. Escuela Politécnica Nacional, Quito-Ecuador, 2014. [Consulta: 11 agosto 2020] Disponible en: <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/8614/3/CD-5790.pdf>.

CAMPOS, N., *Evaluación de la movilidad de clorpirifos a través de perfil de suelo por efecto de la materia orgánica disuelta presente en enmiendas orgánicas*. Santiago de Chile-Chile: UCH, 2016, p. 96.

CANO, E., et al. "Control biológico de plagas agrícolas" *IICA/CATIE*. 2004, vol.47 pp. 1-4.

CARRILLO, L. et al., *Manual de Microbiología de los Alimentos*. Bogotá-Colombia: Applied and Environmental Microbiology, 2007, pp. 101-110.

CAVIERES, F., "Exposición a pesticidas y toxicidad reproductiva y del desarrollo en humanos: Análisis de la evidencia epidemiológica y experimental" *Revista médica de Chile*. 2004, SRC, pp.

873-879.

COHEN, R., et al., "Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*" [En línea]. *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 58, no. 5, pp. 582-594. ISSN 0175-7598. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=11956739&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum.

COLQUIER, G., "Evaluación de crecimiento de micelio de hongos de pudrición blanca con capacidad para biodegradar en condiciones de laboratorio". Universidad Nacional Agraria de la Selva. Boyacá, 1997, pp. 64-72.

DELEY, A., Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo del campamento Sacha 161 utilizando el hongo *P. ostreatus*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba, 2010.

DEMNEROVA, K. et al., "Two approaches to biological decontamination of groundwater and soil polluted by aromatics—characterization of microbial populations". *International Microbiology*, vol. 2005, pp. 205-211.

DIAS, S., et al., *Emprego de Fungos Filamentosos na Biorremediação de Solos Contaminados por Petróleo* [en línea]. Rio de Janeiro : Série Tecnologia Ambiental, 2008. [Consulta: 20 de septiembre 2020], Disponible en: <http://mineralis.cetem.gov.br:8080/bitstream/cetem/324/1/sta-45.pdf>.

FERNÁNDEZ, F., *Guía práctica de producción de Setas (Pleurotus spp.)*. Fungitec Asesoras, Bogotá-Colombia, 2008, p. 54.

GACURA, M., "Effect of *Pleurotus ostreatus* on Bioremediation of River Sediment". *Master of Science Biological Science*, vol. 14, 2009, pp. 3-4.

GADD, G., *Fungi in Bioremediation*. California-USA: D&B Biology, 2001, pp. 16-18.

GAITAN, Y. et al., "Expression of the delta-protocadherin gene *Pcdh19* in the developing mouse embryo". *Gene expression patterns : GEP* [en línea], 2006, vol. 6, no. 8, pp. 893-899. ISSN 1567-133X. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=16682261&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum.

[Consulta: 01 agosto 2020]

GANASH, M. et al., "Pleurotus ostreatus as a Biodegradator for Organophosphorus Insecticide Malathion". *Journal of Environmental Analytical Toxicology*, vol. 87, 2016, pp.99-118.

GAO, D., et al., "A critical review of the application of white rot fungus to environmental pollution control. *Criticals Reviews in Biotechnology*, 2010, pp. 70-77.

GARCÍA, M. et al., "Cometabolismo en la biodegradación de hidrocarburos". *Revista Mexicana de Ingeniería Mecánica*, vol 12, 2008, pp. 1-12.

GARCIA ZARATE, M., et al., "Mapa cualitativo para el análisis de riesgo por BTEX por proximidad con gasolineras en la ciudad de Ensenada, Baja California, México". *Revista de Salud Ambiental*, vol 15, 2015. ISSN 1697-2791.

GIESY, P., et al., "Chlorpyrifos: ecological risk assessment in North American aquatic environments". *Reviews of environmental contamination and toxicology*, vol. 07, 1999 SRC-, pp. 1-10.

GIMSING, A., et al., 2011. "In-situ bioremediation of oil contaminated soil - Practical experiences from Denmark". *EUGRIS* [en línea], 2011, vol. 25, pp. 57-68 Disponible en: http://www.eugris.info/newsdownloads/GreenRemediation/pdf/D05_AnneLouiseGimsing_Paper. [Consulta: 17 Julio 2020]

GÓMEZ, C., *Mohos Y Levaduras.*. México D.F.-México: EdiPan, 2011, p. 68.

GOUMA, S., et al., "Studies on pesticides mixture degradation by white rot fungi". *Journal of Ecological Engineering*, 2019, pp. 16-28. ISSN 22998993. DOI 10.12911/22998993/94918.

GRESHAM, T., 2012. *Brief introduction to water and soil pollution*. Washintong D.C.-USA: EPA, 2012, pp. 68-72.

HERNÁNDEZ, G., et al., "Biorremediación de organofosforados por hongos y bacterias en suelos agrícolas: revisión sistemática". *Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria*, vol.12, 2017 , pp. 139-159.

HESTBJERG, H., et al., " Bioaugmentation of tar-contaminated soils under field conditions using Pleurotus ostreatus refuse from commercial mushroom production". *Environmental toxicology and chemistry*, vol. 22, no. 4, 2003, pp. 692-698.

INIAP, *Muestreo de suelos para analisis quimico con fines agrícola*. Quito-Ecuador: Instituto

Nacional Autonomo de Investigaciones Agropecuarias, 2006, pp. 12-56.

KARAS, P., et al., 2011. "Potential for bioremediation of agro-industrial effluents with high loads of pesticides by selected fungi Environmental fate of rice pesticides View project BIOL-MED project View project". *Springer*, 97, 2011, pp.135-148.

KOSHLUKOVA, S.E. et al., *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition..* Cambirdge-Inglaterra: Cambridge UE, 2014, p. 235.

KULSHRESTHA, G. et al., "Fungal degradation of chlorpyrifos by Acremonium sp. strain (GFRC-1) isolated from a laboratory-enriched red agricultural soil". *Biology and Fertility of Soils*, 2011, pp. 14-28. ISSN 01782762. DOI 10.1007/s00374-010-0505-5.

LEONOR C., *Microbiología Agrícola*. Bogotá-Colombia: UDA,2003, pp. 35-67.

LOPERA, M., et al., "Evaluación de la degradación del plaguicida clorpirifos en muestras de suelo utilizando el hongo *Phanerochaete chrysosporium*". *Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*,2005, pp. 58-69.

MAGAN, N., 2007. *Chapter 4 Ecophysiology: Impact of environment on* [en línea],. Washintong DC-USA: EPA, 2007. [Consulta: 04 agosto 2020] Disponible en: http://www.researchgate.net/publication/223456937_Chapter_4_Ecophysiology_Impact_of_environment_on_growth_synthesis_of_compatible_solutes_and_enzyme_production LK link%7Chttp://www.researchgate.net/publication/223456937_Chapter_4_Ecophysiology_Impact_o.

MARQUEZ, C., et al., "The metabolism of BW2258U89, a GRP receptor antagonist". *Neuropeptides* [en línea], vol. 34, no. 2, 2000, pp. 108-115. ISSN 0143-4179. [Consulta: 01 agosto 2020]Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=10985927&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum.

MARTIN, W.B., et al., "Evanescent cavity ring-down spectroscopy (e-CRDS) of hemoglobin absorption at the silica-water interface". *Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*. [en línea], vol. 74, 2004, pp. 2345-2348. ISSN 1557-170X [Consulta: 15 agosto 2020]. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&DbFrom=pubmed&Cmd=Link&LinkName=pubmed_pubmed&LinkReadableName=RelatedArticles&IdsFromResult=17272200&ordinalpos=3&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_RVDocSum.

MONGE, O., et al., "Efecto del pH en el Proceso de Biosorción de Cobre con Bacterias Aerobias". *BioTecnología*, vol. 12, 2009, pp. 24-47.

MORALES, L., "Los Hongos". *Revista Innovación y Experiencias Educativas*, vol 09, 2009, ISSN 1988-6047, pp.64-67.

MUÑOZ, M., 2011. "Aspectos bioéticos en el control y aplicación de plaguicidas en Chile". Universidad Nacional Agraria. Santiago de Chile, 2011, pp. 56-74.

NÁPOLES, J et al., "Biorremediación de ecosistemas contaminados con xenobióticos". *Universidad de Oriente-Santiago de Cuba.*, vol. 62, 2010, pp. 62-74.

OKPARANMA, R.N., et al., 2011. "Mycoremediation of Polycyclic Aromatic" *African Journal of Biotechnology* [en línea], 2011, pp. 5146-5149. [Consulta: 08 agosto 2020] Disponible en: [http://www.researchgate.net/publication/250309793_Mycoremediation_of_Polycyclic_Aromatic_Hydrocarbons_\(PAH\)_Contaminated_oil-_based_drill-cuttings](http://www.researchgate.net/publication/250309793_Mycoremediation_of_Polycyclic_Aromatic_Hydrocarbons_(PAH)_Contaminated_oil-_based_drill-cuttings) [LKlink%7Chttp://www.researchgate.net/publication/250309793_Mycoremediation_of_Polycyclic_Aromatic_Hydro.](http://www.researchgate.net/publication/250309793_Mycoremediation_of_Polycyclic_Aromatic_Hydrocarbons_(PAH)_Contaminated_oil-_based_drill-cuttings)

PAPINUTTI, V.L., et al., "Degradation of poplar wood by *Fomes sclerodermeus*: production of ligninolytic enzymes in sawdust of poplar and cedar". *Revista iberoamericana de micología*, vol. 20, no. 1, 2010 pp. 16-20. ISSN 1130-1406.

PETTER, F.A., et al., "Incompatibilidade física de misturas entre herbicidas e inseticidas". *Planta Daninha*, vol. 3, 2012, pp. 16-24. ISSN 01008358. DOI 10.1590/S0100-83582012000200025.

QUINTERO, J. "Revisión: Degradación de Plaguicidas Mediante Hongos de la Pudrición Blanca de la Madera" *Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, vol. 62, 2011 pp. 5867-5882.

QUINTERO, J., et al., 2006. "Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos". *Vitae*, vol. 18, 2006, pp. 61-67.

RAMÍREZ, J. et al., Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. " *Prevención de Riesgos Laborables*, vol. 17, 2001, pp. 67-75.

RUBIANO LABRADOR, C., *Aislamiento y caracterización de microorganismos termofílicos anaerobios lipolíticos, proteolíticos y amilolíticos de manantiales termoninerales de Paipa e Iza (Boyacá)*. Boyacá-Colombia: Universidad Nacional Politécnica, 2006, pp. 78-98.

SANCHEZ, J. et al., *Biología y cultivo de Pleurotus spp.* México D.F-México : Uteha-Ecosur,

2001, pp. 15-98.

SIEBE, C., et al., *Manual para la descripción y evaluación ecológica de suelos en el campo*. . México D.F -México: UNAM-IG, 2006.

SIFUENTES, E., "Producción de inóculo de *Pleurotus ostreatus* para uso en biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo". *Universidad Nacional Agraria -La Molina*, vol. 68, 2014, pp. 25-41.

SILVA MORAN, A. *Contaminacion Ambiental*. Lima-Perú: EdiLux, 2017, p.90.

SILVA, S. et al., "Análisis de la contaminación del suelo: Revisión de la normativa y posibilidades de regulación económica". *Universidad de Medellín-Biotecnológica*, vol. 16, 2009 pp. 2-5.

SIMBAÑA, C., 2016. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de la parroquia Taracoa en Francisco de Orellana, mediante el hongo *Pleurotus ostreatus*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba-Ecuador, 2016, pp. 40-63. [Consulta: 12 agosto 2020]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4916/1/236T0192.pdf>.

SINGH, H., "Mycoremediation: fungal bioremediation". *Wiley interscience*, 2006, p. 48. [Consulta: 02 septiembre 2020] Disponible en: <http://www.cabdirect.org/abstracts/20073230382.html>

STAMETS, P., 2005. "Mycelium Running: How Mushroom Can Help Save" *Ten Speed Press*, 2005, pp. 2-5. [Consulta: 02 septiembre 2020] Disponible en: <http://www.scienceopen.com/document?vid=de6dac8e-c670-4a71-b18f-79d9d9efd758>

SUAREZ, R., 2013. "Guía de métodos de biorremediación para la recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos". Universidad Libre, 2013 [Consulta: 16 septiembte 2020] Disponible en: https://revistas.uptc.edu.co/index.php/ciencias_hortícolas/article/view/1259/1255.

SUPREETH, M. et al., "Biotransformation of chlorpyrifos and endosulfan by bacteria and fungi." *Nature*, vol 78, 2017, p. 98.

TOBAR, L., 2018. Evaluación de la eficiencia del hongo *Pleurotus ostreatus*, en la biodegradación de suelos contaminados por carbaryl. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba-Ecuador, 2016, pp. 40-63. [Consulta: 12 agosto 2020]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/8947/1/236T0344.pdf>.

TORRES, K. et al., Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. UNAL, Bogotá-Colombia, 2009, pp. 40-63. [Consulta: 12 agosto 2020]. Disponible en: http://www.bdigital.unal.edu.co/815/1/32242005_2009.pdf.

VILLACÍS, J., Biorremediación de suelos contaminados con benzo[A]pireno empleando *Pleurotus ostreatus*. Universidad Autónoma de México, Nuevo León-México, 2016, pp. 10-93. [Consulta: 12 agosto 2020]. Disponible en: <http://www.ptolomeo.unam.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/132.248.52.100/6162/tesis.pdf?sequence=1>.

VOLKE, T. et al.,. *Tecnologías de remediación para suelos contaminados*. México D.F-México : INE-SEMARNAT, 2002, pp. 14-82

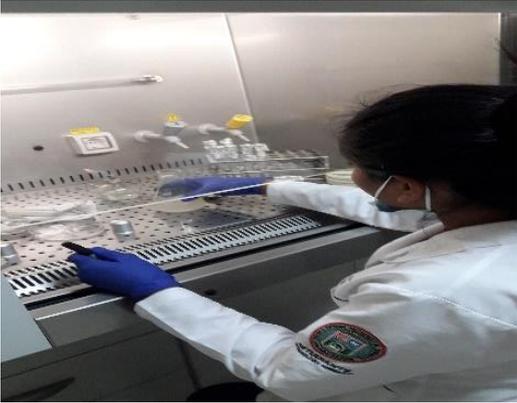
WALI, A., et al., "Lignin degradation and nutrient cycling by white rot fungi under the influence of pesticides". *Biotech*, vol. 82, 2020, pp. 96-109. ISSN 21905738. DOI 10.1007/s13205-020-02251-z.

ANEXOS

ANEXO A: Formato de las encuestas realizada a la comunidad Sagrado Corazón de Jesús.

	<h1>ESPOCH</h1> <p>ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO</p> <hr/>
<p>Encuesta dirigida a los agricultores de la parroquia San Luis comunidad Sagrado Corazón para el trabajo investigativo denominado:</p> <p>“EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DEL HONGO <i>Pleurotus ostreatus</i> EN LA BIODEGRADACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON CLORPIRIFOS”</p> <p>Las siguientes preguntas son netamente informativas, los datos suministrados serán utilizados en la elaboración del trabajo investigativo. Por favor sea honesto en sus respuestas</p> <p style="text-align: center;">Invernadero ...</p> <p>Pregunta 1</p> <p>Cuál de estos cultivos siembra bajo invernadero actualmente.</p> <p>Tomate Riñón () Tomate de Árbol () Pimiento () Pepinillo () Otros()</p> <p>Pregunta 2</p> <p>Utiliza actualmente el plaguicida Lorsban en sus cultivos.</p> <p style="text-align: center;">Si () No ()</p> <p>Si su respuesta fue Si continúe con la siguiente pregunta, caso contrario se agradece su colaboración.</p> <p>Pregunta 3</p> <p>¿Con qué frecuencia utiliza el plaguicida Lorsban en sus cultivos?</p> <p style="text-align: center;">Cada 21 días () Cada 15 días () Cada 7 días ()</p> <p style="text-align: center;">Muchas gracias por su colaboración</p>	

ANEXO B: Evidencia fotográfica de la metodología seguida.

	
<p>1. Implementación las encuestas</p>	<p>2. Toma de muestras</p>
	
<p>3. Preparación de medios PDA</p>	<p>4. Colonización de <i>P.ostreatus</i></p>
	
<p>5. Pruebas de inhibición de <i>P.ostreatus</i> a diferentes concentraciones</p>	<p>6. Lavado de los sustratos de crecimiento</p>



7. Siembra de *P.ostreatus* en los sustratos de crecimiento



8. Incubación de los sustratos de crecimiento a 25°C



9. Colonización de *P.ostreatus* en sustratos de crecimiento



10. Preparación de la suspensión de *P. ostreatus* para su posterior siembra en el primer tratamiento



11. Preparación de *P.ostreatus* en trigo, cebada para el tratamiento dos y tres



12. Siembra de *P.ostreatus* en las muestras de suelo



13. Inicio de la primera etapa de fructificación



14. Presencia de primordios en el tratamiento uno.



15. Cuerpos fructíferos en el tratamiento dos



16. Formación de cuerpos fructíferos en el tratamiento tres



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE
CHIMBORAZO
DIRECCIÓN DE BIBLIOTECAS Y RECURSOS
PARA EL APRENDIZAJE Y LA INVESTIGACIÓN



UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS
REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 08 / 03 / 2021

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: Jessica Adriana Minta Carrillo
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Ciencias
Carrera: Ingeniería en Biotecnología Ambiental
Título a optar: Ingeniera En Biotecnología Ambiental
f. Analista de Biblioteca responsable: Ing. CPA. Jhonatan Rodrigo Parreño Uquillas. MBA.

08-03-2021
0579-DBRAI-UPT-2021