

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

FACULTAD DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES



**EFICIENCIA DE REMOCIÓN DE CUATRO FUNGI DE PUDRICIÓN BLANCA
EN MEDIOS ACUOSOS INDUCIDOS CON COBRE Y ZINC**

Tesis

Para optar al título de:

**INGENIERO EN RECURSOS NATURALES RENOVABLES,
MENCIÓN FORESTALES**

ANALIZ LOLA RUIZ TELLO

Tingo María – Perú

2016

DEDICATORIA

A Dios por guiarme y permitirme seguir adelante siempre.

A mis queridos padres Ladislao Ruiz y Rosario Tello, quienes con su apoyo, dedicación y sacrificio, hicieron posible la culminación de mi formación Profesional.

A mis hermanas Anggela y Marjory por el apoyo y confianza que me brindaron en todo momento.

A Osting por ser mi compañero y mi apoyo en los pasos que doy, y a mi hijo Mathías Valentino por ser la luz de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Agraria de la Selva, en especial a la Facultad de Recursos Naturales Renovables y a su plana docente, que contribuyeron en mi formación profesional.

A los miembros integrantes del jurado: Dr. César, López López, Ing. M.Sc. Ronald, Puerta Tuesta, Blgo. M.Sc. César Augusto, Gozme Sulca por sus orientaciones y valiosos consejos.

Al Ing. M.Sc. Ladislao Ruiz Rengifo, por sus valiosos aportes técnicos y científicos para la realización y culminación del presente trabajo.

A mis amigos que me apoyaron en el trabajo de campo y laboratorio; Tatiana Villanueva, Osting Román y a todas las personas que en forma directa e indirecta han colaborado en la realización y culminación de la presente tesis.

ÍNDICE

Contenido	Pág.
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Generalidades de los hongos.....	3
2.2. Agentes destructores de la madera.....	4
2.2.1.Importancia de los basidiomicetes.....	5
2.2.2.Madera y descomposición	6
2.3. Hongos ligninolíticos	7
2.4. Hongos de pudrición y efectos sobre la madera.....	8
2.5. Taxonomía de las especies de fungi aislados	10
2.5.1. <i>Ganoderma applanatum</i> (Pers.) Pat. 1887	10
2.5.2. <i>Pycnoporus sanguineus</i>	10
2.5.3. <i>Schizophyllum commune</i>	11
2.5.4. <i>Pleurotus ostreatus</i>	12
2.6. Factores que influyen en el desarrollo de los hongos.....	13
2.7. Metales pesados	15
2.7.1.Cobre	15
2.7.2.Zinc	16
2.8. Biorremediación	16

2.9.	Mecanismos implicados en el proceso de biorremoción de metales	17
2.9.1.	Mecanismos físico químicos	17
2.9.	Factores que afectan la bioadsorción	20
2.9.1	pH	20
2.9.2.	Naturaleza del adsorbato	20
2.9.3.	Mecanismos de resistencia	21
2.10.	Hongos como biorremediador	23
2.11.	Investigaciones de fungi como biorremediador	24
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1.	Lugar de ejecución	27
3.1.1.	Ubicación política	27
3.1.3.	Ecología y clima	27
3.2.	Materiales y equipos	28
3.2.1.	Material biológico	28
3.2.2.	Equipos y herramientas de laboratorio	28
3.2.3.	Insumos de laboratorio	28
3.2.4.	Reactivos y metales	28
3.3.	Metodología	29
3.3.1.	Preparación de medio de cultivo	29
3.3.2.	Plaqueado de los medios	30

3.3.3. Colección y descripción	31
3.3.4. Desinfección y siembra	32
3.3.5. Preparación de caldo Sabraud y medio mínimo de sales	33
3.3.6. Activación de los fungi	34
3.3.7. Prueba de desarrollo a distintas concentraciones de Cu y Zn	35
3.3.8. Extracción micelial fúngica y lectura en el espectrofotómetro	36
3.4. Datos a registrar	36
3.4.1. Crecimiento radial de la biomasa micelial	36
3.4.2. Características morfológicas de los fungi aislados en medios nutritivos	37
3.4.3. Densidad celular fúngica	37
3.4.4. Concentración de cobre y zinc	37
3.4.5. Eficiencia de remoción	38
3.5. Diseño experimental	38
3.6. Variables	40
3.7. Análisis estadístico	40
IV. RESULTADOS	42
4.1. Aislamiento y determinación de características morfológicas de cuatro fungi de pudrición blanca colectados en Tingo María	42
4.2. Densidad celular fúngica en medio acuoso con cobre y zinc	48

4.2.1. Densidad celular fúngica en medio acuoso con cobre	48
4.2.2. Densidad Celular fúngica en medio acuoso con zinc.....	52
4.3. Eficiencia de remoción de los fungi en los medios acuosos	56
4.3.1. Capacidad de remoción de los fungi en medio acuoso con cobre	56
4.3.2. Eficiencia de remoción de los fungi en medio acuoso con zinc.....	60
V. DISCUSIÓN	64
5.1. Aislamiento y determinación de características morfológicas de cuatro fungi de pudrición blanca colectados en Tingo María	64
5.2. Densidad celular fúngica en medio acuoso con cobre y zinc a bajas concentraciones	66
5.3. Eficiencia de remoción fúngica en medio acuoso con cobre y zinc a bajas concentraciones.....	67
VI. CONCLUSIONES	70
VII. RECOMENDACIONES.....	71
ANEXOS	83

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Pág.
1. Componentes para la preparación de 1 litro de medio mínimo.....	33
2. Compuestos para la preparación de 1 litro de trozo de elemento (*)	33
3. Descripción de los tratamientos en la remoción de cobre y zinc	40
4. Análisis de Varianza (ANVA).....	40
5. Especímenes de fungi colectados y aislado.....	42
6. Características morfológicas de los fungi aislados en medios nutritivos.....	46
7. Análisis de varianza (alfa=0.05), de la densidad celular fúngica en medio acuoso con cobre.....	48
8. Prueba de Tukey (alfa=0.05), de densidad celular fúngica de las interacciones tratamientos*hongos	49
9. Prueba de Tukey (alfa = 0.05), de la densidad celular en medio acuosa de cobre, con respecto al tipo de fungi de pudrición blanca.....	50
10. Prueba de Tukey (p= 0.05), de la densidad celular fúngica en medio acuoso, con respecto a las concentraciones de cobre.....	51
11. Análisis de varianza (alfa=0.05), de la densidad celular fúngica en medio acuoso con zinc.....	52
12. Prueba de Tukey (alfa=0.05), de densidad celular fúngica de las interacciones tratamientos*hongos	52

13. Prueba de Tukey (alfa = 0.05), de la densidad celular en medio acuosa de zinc, con respecto al tipo de fungi de pudrición blanca.	53
14. Prueba de Tukey (alfa = 0.05), de la densidad celular en medio acuosa de zinc, con respecto a las concentraciones de zinc.	54
15. Análisis de varianza (alfa=0.05), de remoción de los fungi en medio acuoso con cobre.	56
16. Prueba de Tukey (alfa=0.05), de remoción de los fungi en medio acuoso con cobre.....	56
17. Prueba de Tukey (alfa = 0.05), de remoción de los fungi en medio acuoso con cobre, con respecto al tipo de fungi de pudrición blanca.	57
18. Prueba de Tukey (alfa = 0.05), de remoción de los fungi en medio acuoso con cobre, con respecto a las concentraciones de cobre.....	58
19. Análisis de varianza (alfa=0.05), de remoción de los fungi en medio acuoso con zinc.	60
20. Prueba de Tukey (alfa=0.05), de remoción de los fungi en medio acuoso con zinc.	60
21. Prueba de Tukey (alfa = 0.05), de remoción de los fungi en medio acuoso con zinc, con respecto al tipo de fungi de pudrición blanca.	61
22. Prueba de Tukey (alfa = 0.05), de remoción de los fungi en medio acuoso con zinc, con respecto a las concentraciones de zinc.	62
23. Promedio de crecimiento radial de micelio de los fungi en medio de cultivo (mm).....	85

24. Biomasa micelial de los fungi, obtenidos en medio acuoso con el elemento cobre.....	85
25. Biomasa micelial de los fungi, obtenidos en medio acuoso con el elemento zinc.	87
26. Datos de eficiencia de remoción de cobre, por los fungi de pudrición blanca.....	88
27. Datos de eficiencia de remoción de zinc, por los fungi de pudrición blanca.....	91

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pág.
1. Partes de un hongo prototipo	4
2. Medios de cultivo, a) Agar Extracto de Malta, b) Agar Papa Dextrosa	29
3. Medio de cultivo autoclavado Agar Papa Dextrosa (lado izquierdo), Agar Extracto de Malta (lado derecho)	30
4. Plaqueado de los medios de cultivo PDA y AEM	31
5. Caldo Sabouraud esterilizado para ser repicado con micelio de los hongos en estudio.....	34
6. Prueba de desarrollo a distintas concentraciones de Cu y Zn (a) Envases con medio mínimo de sales con las concentraciones de Cu y Zn, (b) esterilizando en autoclave, (c) matraces inoculados con el micelio de cada hongo en las distintas concentraciones de los metales.....	35
7. Extracción micelial fúngica, (a) Centrifugado del medio para separar el micelio (b) filtrado.	36
8. Esquema experimental	39
9. <i>Ganoderma applanatum</i> (Pers.) Pat. (a) basidiocarpo, (b) poros circulares pequeños vistos al estereoscopio, (c y d) micelio crecimiento en forma irregular de color blanco en ambos medios de cultivo agar extracto de malta y agar papa dextrosa.	42

10. <i>Pycnoporus sanguineus</i> (L.) Murril (a) píleo e himenóforo, (b) poros vistos al estereoscopio (c) micelio en medio agar extracto de malta (d) micelio en medio agar papa dextrosa.	43
11. <i>Schizophyllum commune</i> Fries (a) láminas en el himenóforo (b) píleo o sombrero del basidiocarpo (c) micelio en medio agar papa dextrosa (d) micelio en medio agar extracto de malta.	43
12. <i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq. ex Fr) Kumm (a) sombrero o píleo (b) micelio en medio agar papa dextrosa (c) micelio en medio agar extracto de malta.	44
13. Curva de crecimiento radial de micelio de <i>Ganoderma applanatum</i> (mm) en placas Petri de 90 mm de diámetro.	44
14. Curva de crecimiento radial de micelio de <i>Pycnoporus sanguineus</i> (mm) en placas Petri de 90 mm de diámetro.	45
15. Curva de crecimiento radial de micelio de <i>Schizophyllum commune</i> (mm) en placas Petri de 90 mm de diámetro.	45
16. Curva de crecimiento radial de micelio de <i>Pleurotus ostreatus</i> (mm) en placas Petri de 90 mm de diámetro.	46
17. Densidad celular en medio acuoso con cobre y el tipo de fungi de pudrición blanca.	50
18. Densidad Celular fúngica en medio acuoso con cobre en las concentraciones (tratamientos).....	51
19. Densidad celular en medio acuosa de zinc con los fungi de pudrición blanca.....	54

20. Densidad Celular fúngica en medio acuoso con zinc en las concentraciones	55
21. Eficiencia de remoción en medio acuoso con cobre para los fungi de pudrición blanca.	58
22. Eficiencia de remoción de los fungi en medio acuoso con cobre, respecto a las concentraciones de cobre.	59
23. Eficiencia de remoción en medio acuoso con zinc, con respecto a fungi de pudrición blanca	62
24. Eficiencia de remoción de los fungi en medio acuoso con zinc, con respecto a las concentraciones de zinc	63

RESUMEN

En la Amazonía por su alta biodiversidad, existen muchas especies de hongos de pudrición blanca que requieren mayores investigaciones para su uso en futuras aplicaciones biotecnológicas. La finalidad de la presente investigación fue aislar cuatro fungi de pudrición blanca, determinar la biomasa micelial y capacidad de remoción de cobre y zinc con medio mínimo de sales minerales. Para tal fin se aislaron en agar papa dextrosa y agar extracto de malta a los fungi *Ganoderma applanatum*, *Pycnoporus sanguineus*, *Schizophyllum commune* y *Pleurotus ostreatus* colectados del Bosque Reservado y Jardín Botánico de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María. Para las pruebas se consideraron concentraciones de 10, 30 y 50 mg/L de cobre y de zinc; lográndose un crecimiento en biomasa micelial en 2% del volumen del medio acuoso. Se ha obtenido una capacidad de remoción de cobre (95.04 a 96.77 %) y en orden de importancia con *P. sanguineus*, *S. commune*, *P. ostreatus* y *G. applanatum*, y la capacidad de remoción de zinc (97.96 a 99.05 %) y en orden de importancia con *P. ostreatus*, *S. commune* y *P. sanguineus*. En ambos casos con la concentración de 50 mg/L se ha obtenido el mayor promedio de remoción (95.14%).

I. INTRODUCCIÓN

El abundante material orgánico que se genera en los bosques, en su mayoría son descompuestos hasta su total mineralización por los hongos de la clase Ascomycota y Basidiomycota (CHAPARRO y ROSAS, 2006); estos organismos juegan un papel importante en el ecosistema porque degradan el material orgánico generando pudriciones, y por consiguiente constituyen un factor importante para la dinámica de los bosques.

En nuestro país y particularmente en la Amazonía se han realizado muy pocos estudios referidos a hongos nativos de pudrición, así como las posibilidades de utilizarlos biotecnológicamente. Todas las especies de hongos de una u otra forma tienen importancia para nuestro país, por lo que es necesaria su investigación.

Es necesario contar con cepas de hongos nativos colectados de nuestro medio y poderlos conservar ex situ, como base para usar en posteriores investigaciones a nivel de resistencia natural de maderas al ataque de hongos, a nivel industrial, biotecnológico y en la biorremediación. En el ambiente, se encuentran contaminantes más nocivos que otros, de manera particular, aquellos que no se degradan fácilmente porque poseen estructuras químicas bastante estables, permanecen en el ambiente por años y son

incorporados a las cadenas alimenticias en un proceso llamado bioacumulación (COELLO, 2011). Estos compuestos, también denominados “recalcitrantes” representan un riesgo muy alto para la salud. Los microorganismos vivos, son una buena alternativa para remover contaminantes xenobióticos de manera económica y amigable con el ambiente; específicamente, uno de ellos es el micelio de los hongos ligninolíticos.

De acuerdo al presente trabajo de investigación se plantea la siguiente interrogante: ¿Cuál es el grado de capacidad de los hongos de pudrición blanca en la remoción de metales en medio acuoso? En tal sentido se planteó la siguiente hipótesis: los hongos de podredumbre blanca aislados en laboratorio tienen capacidad de remover el 60% de metales en medio acuosos.

Objetivo general

- Determinar la eficiencia de remoción de cuatro fungi de pudrición blanca en medios acuosos inducidos con cobre y zinc.

Objetivos específicos

- Aislar y determinar las características morfológicas del micelio de cuatro fungi de pudrición blanca colectadas en Tingo María.
- Determinar la densidad celular fúngica sometidos a contaminantes inducidos en medio acuosos con cobre y zinc.
- Determinar la eficiencia de remoción de los hongos sobre contaminantes inducidos con cobre y zinc.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

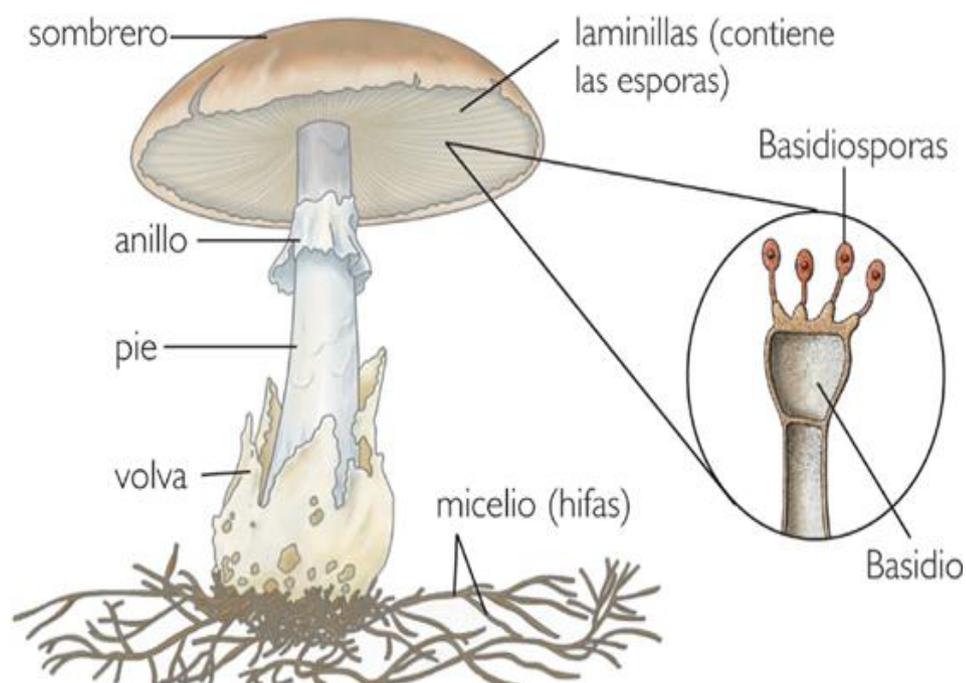
2.1. Generalidades de los hongos

Los hongos son los organismos más abundantes, después de los insectos, existen aproximadamente 1.5 millones de hongos y unos 8 millones de insectos (HAWKSWOTH, 2002; BOA, 2005). Los hongos constituyen un reino que contiene numerosas especies y que hasta la actualidad sólo se ha identificado aproximadamente un 5 por ciento del total que habita en la tierra (ROBLEDO, 2006).

La naturaleza de los hongos es relativamente simple, el cuerpo fructífero está constituido de células individuales llamadas hifas, las cuales son muy finas que presentan un diámetro de aproximadamente 2 micras que poseen ramificaciones y paredes transparentes constituidas por quitina. El micelio, mediante la secreción de enzimas se encarga de suministrar alimento a los hongos, por lo tanto, las hifas como el micelio son los verdaderos destructores de la madera (NOVA, 2006).

La reproducción se da por medio de cuerpos microscópicos denominados esporas, equivalentes a las semillas en las plantas pero mucho más pequeñas (micrones) y usualmente reproducidas en gran número (HERRERA y ULLOA, 1990).

Una vez que el hongo ha desarrollado suficiente micelio forman los cuerpos fructíferos (Figura 1). El cuerpo de fructificación o basidiocarpo, es uno de los atributos más importantes, sus características morfológicas y la ubicación en el sustrato revelan características ecológicas de las especies (RYVARDEN, 2007).



Fuente: HERRERA y ULLOA, 1990.

Figura 1. Partes de un hongo prototipo

2.2. Agentes destructores de la madera

La lignina en la madera confiere una protección física a la celulosa y hemicelulosa contra el ataque enzimático. Existe una gran cantidad de organismos (bacterias y hongos) que degradan la celulosa y hemicelulosa, pero en lo referente al ataque y mineralización de la lignina el número de organismos es mucho más limitado. Los únicos organismos descritos con

capacidad de degradar y mineralizar la lignina son un grupo de basidiomicetes causantes de pudrición blanca. Éstos conforman el 98 % de todos los hongos que habitan y degradan la madera (RYVARDEN, 1995).

Los hongos que degradan madera se diferencian en dos grandes grupos: los mohos y los hongos cromógenos y el otro grupo de hongos de pudrición. Los del primer grupo se alimentan de las sustancias de reserva de la madera y no producen degradaciones en la pared celular, por lo que no afectan a las propiedades mecánicas; mientras que los hongos de pudrición son los que generan daños graves en la madera. Su efecto es la pérdida de densidad y resistencia, acompañada de un cambio de coloración, y al final del proceso se destruye por completo (NOVA, 2006).

2.2.1. Importancia de los basidiomicetes

Tienen esencial importancia en la naturaleza por su alta capacidad de descomponer o degradar la lignina (AGRIOS, 2005). Otros son causantes de las royas y los carbones (producen enfermedades en las plantas), y algunas setas forman ectomicorrizas, es decir; una simbiosis entre los hongos y los árboles (PEREZ-MORENO, 2012).

Existe un grupo de especies que son comestibles, de ellos actualmente los más cultivados comercialmente son el champiñón (*Agaricus bisporus*), la seta (*Pleurotus spp.*) y el shiitake (*Lentinula edodes*) (ANDRADE *et al.*, 2012). Además, los hongos tienen aplicaciones en la medicina humana,

los cuales son altamente promisorios como fuente de metabolitos bioactivos. Se hacen referencia a *Ganoderma lucidum*, *Phellinus linteus* y *Formes fermentarius*, que poseen compuestos con actividad antiviral, antitumoral, hematológica, antioxidante, antiinflamatoria y antidiabetes (SMÂNIA *et al.*, 2013; AQUEVEQUE, 2006).

Debido al sistema multienzimático extracelular, los basidiomicetos son los únicos organismos hasta hoy conocidos capaces de mineralizar eficientemente la lignina y convertirla en CO₂ y H₂O, como parte fundamental del ciclo del carbono (CRAWFORD, 1981).

2.2.2. Madera y descomposición

La madera es uno de los materiales más resistentes a la degradación biológica y, su resistencia se debe a su arreglo anatómico y a su composición química. Se compone principalmente de celulosa (40-50% de peso seco), hemicelulosa (25-40%) y lignina (25-35%), con muy bajos niveles de azúcares disponibles que pueden ser atacados por protozoos, bacterias y hongos de diferentes grupos taxonómicos. Contienen componentes potencialmente tóxicos para los hongos. En árboles latifoliados generalmente se encuentran taninos, mientras que en coníferas se encuentran compuestos fenólicos como terpenos, estilbenos, flavonoides y tropolones (DEACON, 2002).

La celulosa es el polímero más importante de las plantas, constituyendo entre 40 a 50 % de la pared celular de la planta madura. La

lignina es el segundo polímero natural más importante del planeta después de la celulosa. Sin embargo, es más resistente a la descomposición que la celulosa; su papel primario en la pared celular de la madera es proteger los carbohidratos del ataque microbiano. La lignina es eficientemente degradada en la naturaleza principalmente por los hongos de la pudrición blanca (CHAPARRO y ROSAS, 2006).

2.3. Hongos ligninolíticos

Los hongos ligninolíticos, han desarrollado un sistema enzimático único y no específico que funciona en el ambiente extracelular. La gran diversidad estructural de los contaminantes que son degradados por estos hongos, les concede un uso potencial en biorremediación. Estos hongos son efectivos en la degradación de una diversidad de contaminantes ambientales peligrosos y han sido bastante estudiados en la degradación de compuestos xenobióticos. Su capacidad de degradación de un compuesto tan complejo como la lignina ha hecho considerar a estos hongos como una posible alternativa para la eliminación de otros muchos compuestos de baja biodegradabilidad (DÁVILA y VÁSQUEZ, 2001).

Los hongos de podredumbre blanca son capaces de degradar la lignina por medio de la secreción de enzimas extracelulares mediante su metabolismo secundario. Principalmente estas enzimas son la fenoloxidasas (lacasa) y dos peroxidasas (manganeso peroxidasas (MnP) y lignina peroxidasas (LiP)), esenciales para la degradación de la lignina. Para lograr su completa

mineralización éstas enzimas por lo general se combinan con otros procesos que requieren la presencia de otras enzimas, incapaces de la degradación de lignina por ellas mismas (MÉNDEZ, 2013).

2.4. Hongos de pudrición y efectos sobre la madera

Los troncos recién caídos contienen azúcares en las columnas de las brácteas del parénquima que se encuentran longitudinalmente en el tronco. Estas columnas son colonizadas rápidamente por hongos que pueden cambiar el color de la madera y reducir su valor comercial (mancha en la madera). Una vez que suceda esta fase, la madera se vuelve accesible solo para los hongos de pudrición (Ascomycota y en especial Basidiomycota) (DEACON, 2002; CHAPARRO y ROSAS, 2006).

Las principales categorías en la descomposición de la madera de acuerdo al modo de ataque y de las condiciones en que estas crecen son la pudrición blanda, pudrición café y la pudrición blanca (DEACON, 2002)

Pudrición blanda: ocurre cuando el daño causado por el microorganismo es muy superficial. La madera pierde fuerza mecánica y se torna húmeda y esponjosa. Es causado por Ascomicetes y Deuteromycetes. Podemos mencionar a *Chaetomium globosum*, *Trichoderma spp*, *Daldinia concéntrica*, etc.

Pudrición café: causada principalmente por basidiomicetes, los cuales degradan la hemicelulosa y la celulosa. Los carbohidratos son

removidos, pero la lignina es modificada simplemente hasta cierto límite. La madera toma un color café oscuro debido a la degradación de la celulosa que es de color blanco, quedando el color café de la lignina residual. Este grupo de hongos representa solo el 7 % de los basidiomicetes causantes de pudrición en la madera. Alguno de los hongos causantes son *Fomitopsis pinicola*, *Poria placenta*, *Tyromyces palustre*, *Gloeophyllum sp* etc.).

Pudrición blanca: sucede cuando los microorganismos que atacan la madera degradan profunda y completamente los componentes lignocelulósicos. La madera toma una apariencia blanquecina, húmeda, blanda, esponjosa y en las etapas avanzadas la madera se debilita notablemente (CHAPARRO y ROSAS, 2006). Alguno de los hongos causantes son *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus sanguineus*, *Trametes versicolor*, *Ganoderma*

GONZÁLES (1996) menciona que los hongos *applanatum*, *Schizophyllum commune*, etc. que utilizan la lignina como fuente de alimentación, causan la podredumbre blanca, y los que degradan la celulosa causan la podredumbre negra, también llamada parda, y que además existe una combinación de ambas para dar lugar a la pudrición mixta.

Los hongos son entre uno de los pocos microorganismos capaces de degradar lignocelulosa, los más efectivos son los del género basidiomicetes pudridores de madera, particularmente los de pudrición blanca que atacan los

componentes de la pared celular (MUÑOZ *et al.*, 1997). Estos hongos son capaces de degradar eficientemente la lignina y son altamente especializados.

2.5. Taxonomía de las especies de fungi aislados

2.5.1. *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. 1887

Reyno	:	Fungi
División	:	Basidiomycota
Clase	:	Agaricomycetes
Orden	:	Polyporales
Familia	:	Ganodermataceae
Género	:	Ganoderma
Especie	:	<i>G. applanatum</i> (Pers.) Pat. 1887

Los hongos polyporales son clasificados por tener muchos poros pequeños en la parte inferior del cuerpo fructífero, en los cuales contienen las esporas, y una apariencia leñosa o coriácea. Crecen sobre madera en descomposición absorbiendo los nutrientes a través de pequeños tubos conocidos como hifas, y desarrollan el cuerpo fructífero sobre troncos. Las especies de *Ganoderma* están entre los hongos que pueden crecer bajo condiciones elevadas de calor y humedad y, son usualmente encontrados en regiones tropicales y subtropicales (TELLO, 2010).

2.5.2. *Pycnoporus sanguineus*

Reyno	:	Fungi
-------	---	-------

División	:	Basidiomycota
Clase	:	Basidiomycetes
Orden	:	Poriales
Familia	:	Coriolaceae
Género	:	Pycnopus
Especie	:	<i>Pycnopus sanguineus</i> (L.) Murrill

Abhimenio: Píleo semicircular o abanicados 2 – 7 cm. de diámetro, 1 – 5 cm de alto, color rojo a anaranjado, vistosos, con zonas concéntricas. Himenio: Poros de formas irregulares de color rojizo o naranja intenso, el margen con un borde color naranja claro. Estípite: anaranjado, ya sea corto o sésil, se adhiere lateralmente al sustrato coriáceo. Hábitat: Sobre troncos caídos en zonas asoleadas y alteradas, incluso sobre troncos quemados.

2.5.3. *Schizophyllum commune*

Reyno	:	Fungi
División	:	Basidiomycota
Clase	:	Basidiomycetes
Orden	:	Agaricales
Familia	:	Schizophyllaceae
Género	:	Schizophyllum
Especie	:	<i>Schizophyllum commune</i> Fr.

Posiblemente es el hongo más generalizado en existencia, encontrándose en todos los continentes excepto la Antártida (FERNÁNDEZ, 2004). Tiene una gran adaptación para un clima con lluvias esporádicas. Crece únicamente sobre madera en descomposición. Capaz de sobrevivir en época seca, en madera expuesta al sol (QUAN, 2009).

Este hongo aparece en pequeños grupos o filas en las ramas muertas de los árboles. Es uno de los más ampliamente distribuidos de todos los hongos y se encuentra en todo el mundo (HALL, 2003). Común sobre troncos tirados o cercados, en donde crece en grandes conjuntos, siempre en lugares soleados (GASTÓN, 2003).

Se desarrolla adecuadamente en medios de cultivo para hongos como PDA, EAM al 2% y en el medio extracto de levadura a una temperatura de 27 °C y una humedad relativa del 70% (QUAN, 2009).

2.5.4. *Pleurotus ostreatus*

Reyno	:	Fungi
División	:	Basidiomycota
Clase	:	Basidiomycete
Orden	:	Agaricales
Familia	:	Pleurotaceae
Género	:	Pleurotus
Especie	:	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jack. Ex Fr) Kumm

Crece en troncos o sobre desechos agrícolas o agroindustriales, que están constituidos principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina en porcentaje de 40-60, 15-50 y 10-30 respectivamente, alimentándose de estos nutrientes y degradándolos, y donde las condiciones ambientales sean óptimas. El micelio de este hongo puede crecer en una temperatura entre 0 y 35 °C, con temperatura óptima de 30 °C, y en un rango de pH entre 5,5 y 6,5 y humedad relativa de 85 a 90%, siendo la óptima de 85 a 90% (MARTÍNEZ, 2012).

2.6. Factores que influyen en el desarrollo de los hongos

Las condiciones ambientales son determinantes en la formación del cuerpo fructífero, ésta es un proceso sensible, influenciado por muchos factores; como la luz, la temperatura, la humedad, la salinidad y el pH (GAYOSO, 2016).

Los hongos son organismos cosmopolitas que pueden desarrollarse en los sustratos más variados, en todos los climas de la tierra e incluso en condiciones extremas. Su ámbito es tan amplio, que sus esporas incluso sobrepasan la atmósfera (AIRA *et al.*, 2003).

El desarrollo fúngico está supeditado a ciertas condiciones ambientales tales como la humedad relativa, temperatura, precipitación, inversiones térmicas, contaminación, disponibilidad de sustrato y actividades humanas, las que influyen de manera determinante en la proliferación y

propagación de las partículas fúngicas hacia los espacios interiores (GUERRERO *et al.*, 2003).

La mayor parte de las especies fúngicas son cosmopolitas aunque algunas de ellas tienen una distribución geográfica restringida y específica. Los hongos se encuentran ampliamente distribuidos, viven en cualquier sitio que presente materia orgánica, humedad, y temperatura comprendida entre 4 y 60°C. Pueden vivir en climas ecuatoriales, tropicales, subtropicales, templados y aún en los fríos, siempre que la temperatura no sea menor a 0 °C, desde el nivel del mar hasta altitudes de más de 4000 metros, en donde se encuentran los últimos vestigios de vegetación, pueden desarrollarse en lugares húmedos, en sitios semidesérticos y aún en desérticos en épocas de ligera humedad en los suelos (HERRERA y ULLOA, 1990).

La temperatura óptima para el desarrollo de los hongos se encuentra entre 20 y 35 °C, a menos de 0 °C los hongos entran en dormancia; por encima de la temperatura máxima tolerable el hongo muere, así lo indica (RODRÍGUEZ, 1996).

Los hongos consumen compuestos orgánicos e inorgánicos. Los elementos inorgánicos incluidos en el sustrato artificial son: fósforo, potasio, nitrógeno, sulfuro y magnesio, y en menor proporción: fierro, cobre, zinc y boro. El extracto de malta – agar es el más recomendado para las investigaciones científicas de pudrición de la madera, debido a que es rico en azúcares (KING y ENDERSON, 1980).

2.7. Metales pesados

Tradicionalmente se llama metal pesado a aquel elemento metálico que presenta una densidad superior a 5 g/mL, para efectos prácticos en estudios medioambientales se amplía esta definición a todos aquellos elementos metálicos o metaloides, de mayor o menor densidad, que aparecen comúnmente asociados a problemas de contaminación. Algunos de ellos son esenciales para los organismos en pequeñas cantidades, como el Fe, Mn, B, Co, As, V, Cu, Ni o Mo, y se vuelven nocivos cuando se presentan en concentraciones elevadas, mientras que otros no desempeñan ninguna función biológica y resultan altamente tóxicos, como el Cd, Hg y el Pb. (ORTÍZ *et al.*, 2007).

2.7.1. Cobre

En el ambiente se encuentra comúnmente con una valencia de 2, pero puede existir con valencias 0, +1 y +3. El Cu se presenta en diversas sales minerales y compuestos orgánicos, así como en forma metálica. El metal es poco soluble en agua, las sales o soluciones moderadamente ácidas, pero pueden ser disueltas en ácido nítrico y sulfúrico así como en soluciones básicas de hidróxido de amonio o carbonato (MARRUGO y PATERNINA, 2011). El cobre es un metal que ocurre naturalmente en el ambiente en rocas, el suelo, el agua y el aire. Es esencial para plantas y animales (incluso seres humanos). Por lo tanto, las plantas y los animales deben absorber cobre de los alimentos o bebidas que ingieren, o del aire que respiran.

2.7.2. Zinc

El zinc es el 24° elemento en abundancia en la corteza terrestre, de la que constituye 0.004%. Junto con el hierro, el cobre, el manganeso y el níquel, entre otros, el zinc es miembro de la serie de metales de transición en la tabla periódica de los elementos. Tiene un número atómico de 30 y un peso atómico de 65.38. El óxido de zinc es un polvo blanquecino, poco soluble en agua en un pH neutral. El sulfato de zinc forma gránulos azulados; es muy soluble en agua y tiene un sabor metálico intenso. Compuestos de zinc con moléculas pequeñas constituyen el acetato o el gluconato (SOLOMS, 2013).

El tema ambiental por zinc, y sus efectos sobre la población, no están muy documentados como el de otros elementos. Sin embargo, cada vez son más nutridos los estudios que ponen de manifiesto su elevada concentración en aguas subterráneas y de superficie, y en las destinadas al consumo humano, siempre acompañando a concentraciones elevadas de otros elementos: cadmio, plomo y mercurio (PRASAD, 2009).

2.8. Biorremediación

La biorremediación usando hongos blancos de putrefacción es una tecnología muy prometedora la cual está siendo estudiada (COELLO, 2011). La biorremediación es el uso de agentes biológicos, esencialmente microorganismos, para eliminar o reducir la concentración de sustancias tóxicas presentes en un sitio o material contaminado. Se presenta como una

alternativa viable y económica frente a los métodos clásicos de descontaminación.

Implica el uso de microorganismos naturales o introducidos para degradar, transformar o remover compuestos tóxicos a productos metabólicos inocuos o menos tóxicos, proporcionando una solución eficiente y económicamente atractiva (CARBAJAL, 2014). Dentro de estos organismos, los hongos causantes de pudrición blanca muestran un gran potencial para su utilización en biorremediación.

2.9. Mecanismos implicados en el proceso de biorremoción de metales

2.9.1. Mecanismos físico químicos

MORALES y RUIZ (2008) indican que, la pared celular realiza la retención del metal mediante una interacción fisicoquímica del metal con grupos amino e hidroxilo propios de la quitina presentes en la pared. Esta interacción se traduce en la formación de un enlace covalente coordinado pues el ion metálico actúa como un átomo central que dispone de orbitales vacíos capaces de aceptar pares de electrones. Estos pares de electrones son precisamente donados. La formación de este enlace, puede estar acompañada por la dislocación de protones y dependiente en parte del grado de protonación de la pared que es determinado por el pH (GUPTA *et al.*, 2000; NAVARRO *et al.*, 2006).

– **Intercambio Iónico**

El intercambio iónico se expresa como una reacción en equilibrio en donde los reactivos están en cantidades químicamente equivalentes y se desarrolla hasta que se ha agotado la capacidad estequiométrica. En otras palabras, implica que al captar iones metálicos por parte de la pared va acompañado de la liberación al medio de cationes tales como Ca^{+2} , Mg^{+2} , K^{+1} , Na^{+2} y H^{+1} hasta alcanzar el equilibrio de la reacción (CASTRO, 1998 ; IQBAL *et al.*, 2007).

– **Quelación**

La quelación implica inmovilizar un ion metálico con ligandos de bajo peso molecular para crear un complejo o una molécula químicamente estable. Algunos estudios revelan que la resistencia de los fungi de la pudrición blanca y café de la madera a sales de metales pesados, se debe al desarrollo de sideróforos o quelantes, entre los que se destacan el catecol y el ácido oxálico. El catecol moviliza hacia el interior de la célula fúngica el hierro (REYES, 2007). El ácido oxálico es capaz de inmovilizar iones metálicos para formar sales de oxalato en forma de cristales disminuyendo la solubilidad por ende la disponibilidad de estos en el medio (MALAGRE *et al.*, 2002).

– **Adsorción**

Consiste en un fenómeno físico-químico que radica en la capacidad de los denominados materiales biológicos (biomasa) vivos o muertos, para

acumular metales pesados principalmente de aguas residuales, involucrando al metabolismo microbiano, resaltando los procesos fisicoquímicos de adsorción desorción o absorción de dichos elementos metálicos (MARIN *et al.*, 2015; GADD, 1986; KAPOOR, 1995). Los hongos, y también las algas, bacterias, y levaduras, han demostrado ser potenciales biosorbentes de metales (GADD, 1993; VOLESKY, 1995).

La biosorción como proceso presenta ventajas sobre los métodos de tratamiento convencionales ya que incluye: bajo costo; alta eficiencia; minimización de productos químicos; no se requiere nutrientes adicionales; existe la posibilidad de regeneración de los biosorbentes, y la de recuperación de los metales involucrados. La biosorción involucra una fase sólida que es el material biológico (biomasa) adsorbente o biosorbente; y una fase líquida o disolvente en la cual están disueltos los elementos metálicos generalmente en su forma iónica (sorbato) (GOLD y ALLIC, 2001).

La adsorción es un proceso de separación mediante el cual ciertos componentes de una fase fluida (líquida o gaseosa) son transferidos hacia un sustrato sólido, quedando física o químicamente enlazados en la superficie del adsorbente (KURNIAWAN, 2003). El adsorbente se caracteriza por su alta porosidad, con poros de tamaño extremadamente pequeño que dan lugar a que la superficie interna del adsorbente sea mucho mayor que la externa. Por lo tanto las diferencias en el peso molecular o polaridad hacen que unas moléculas sean retenidas más fuertemente que otras, lo que hace que el proceso de adsorción sea selectivo (GADD, 1993).

El proceso de adsorción se ve influenciado por diferentes factores como el pH, la temperatura, la naturaleza del adsorbente, el tipo y concentración de adsorbato, entre otros (HIDALGO *et al.*, 2004)

2.9. Factores que afectan la bioadsorción

2.9.1 pH

La pared fúngica a pH menor de 3.5, sufre una protonación de los grupos fosfatos y carboxilos cargándolos positivamente o menos negativo, lo cual permite que se promueva una repulsión electrostática entre los iones metálicos y la pared, al mismo tiempo se origina una competencia entre protones como el H^+ y los metales. Por el contrario a pH por encima de 4 y menores de 6 la carga negativa de la pared favorece un acercamiento aniónico con los iones del metal (LOUKIDOU, 2004).

2.9.2. Naturaleza del adsorbato

El adsorbato es un factor influyente en el equilibrio de adsorción. Existe una regla general que consiste en que el soluto polar preferirá la fase que es más polar. En otras palabras, un soluto polar será fuertemente adsorbido por un adsorbente polar, cuando esté en un disolvente no polar (CASTRO, 1998).

Otro factor referente a la naturaleza del adsorbato en el caso de los metales, se refiere al radio atómico del metal, pues se cree que a mayor

tamaño de este disminuye la afinidad por los ligandos de la pared (QUINGBIAO *et al.*, 2004)

- **Concentración inicial de metal**

Para determinar la efectividad de un material sorbente hay que conocer cuál es la cantidad máxima de metal (la capacidad máxima) que puede adsorber (HIDALGO *et al.*, 1998).

- **Temperatura**

La temperatura adecuada para una alta remoción de metales con fungi está entre 25 – 30 °C, además sugiere que la temperatura puede afectar a la adsorción física entre el metal y el fungi (QUINGBIAO *et al.*, 2004).

2.9.3. Mecanismos de resistencia

- **Mecanismos fisiológicos y genéticos**

La supervivencia de los fungi depende de sus adaptaciones intrínsecas y de las propiedades fisicoquímicas del medio ambiente. Posiblemente esta adaptación sea a través de mecanismos fisiológicos y genéticos, activados o inducidos por metales, que controlan determinados eventos bioquímicos. En diversos grupos taxonómicos de fungi, los metales pesados son quelados por componentes extracelulares e intracelulares, de bajo peso molecular. La interacción de los fungi con los metales pesados ha desencadenado respuestas adaptativas, ya que presentan tolerancia a altas

concentraciones y una adaptación fisiológica muy rápida (GUTIÉRREZ *et al.*, 2008; BALDRIAN, 2002).

La producción de ácido oxálico por parte de cepas de fungi de la pudrición café, lograron precipitar el cobre en la forma insoluble de oxalato de cobre. Entre los fungi de la pudrición blanca, las cantidades más altas de oxalato se producen por *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor* (BALDRIAN, 2002). Uno de los sistemas de quelación de los metales, desarrollado por los basidiomicetos es el oxalato. El ácido oxálico inmoviliza iones metálicos solubles a compuestos de oxalato insolubles, lo cual disminuye la biodisponibilidad de estos metales y aumenta la tolerancia (REYES, 2007).

Los fungi producen una envoltura hifal extracelular compuesta principalmente por polisacáridos; que atrapan los iones metálicos, ofreciendo así una primera barrera contra el metal. Otro mecanismo es la síntesis intracelular de metalotioninas, proteínas que tienen una función en la desintoxicación, almacenamiento y regulación de la concentración interna del metal (BALDRIAN, 2002).

A nivel genético se reportan mecanismos para evitar lesiones premutagénicas en el ADN, especialmente bajo la acción del cromo; entre ellas están la reparación por escisión de nucleótidos (NER) que se encarga de la remoción de lesiones a nivel estructural y el gen es encargado de su expresión (*rad1*) (O'BRIEN *et al.*, 2002).

- Mecanismos enzimáticos

Los fungi de la podredumbre blanca tienen un sistema enzimático el cual está comprendido por las enzimas Lignina peroxidasa (LiP), que por síntesis endógena de H_2O_2 , oxida veratril alcohol, a la vez oxida compuestos aromáticos no fenólicos, Manganese peroxidasa (MnP) que oxida componentes fenólicos de la lignina, mediante la reacción de oxidación del Mn^{2+} a Mn^{3+} , la cual es dependiente del H_2O_2 y Lacasa (LAC), una fenol oxidasa con cobre, que oxida anillos de la lignina (POINTING, 2001).

2.10. Hongos como biorremediador

Los hongos son efectivos porque producen una enzima extra celular llamada lacasa, ésta cataliza una reacción que degrada lignina, un compuesto aromático. Para catalizar estas reacciones poderosas la enzima requiere peróxido de hidrógeno, la cual el hongo produce.

En los últimos años se ha empleado ampliamente debido a que el sistema ligninolítico de este hongo está compuesto por enzimas oxidativas no específicas capaces de metabolizar y mineralizar hidrocarburos policíclicos aromáticos y colorantes artificiales causantes de contaminación ambiental. Esta actividad parece estar relacionada a la producción de enzimas como manganese peroxidasa y lacasa.

La biodegradación por basidiomycetes se considera un proceso no específico, oxidativo y que es llevado a cabo fundamentalmente por la acción

de tres diferentes tipos de enzimas: Lignina peroxidasa (LiPs), Mn-Peroxidasas (Mn- Ps), las cuales dependen de peróxido de hidrógeno, y Lacasa, la cual depende de oxígeno molecular (BALDRIAN, 2002).

2.11. Investigaciones de fungi como biorremediador

Investigaciones con tres cepas de *Pleurotus* en soluciones de cobre, reportan que la biomasa micelial ha retenido un promedio de 90% de cobre en condiciones de laboratorio (MARÍN *et al.*, 2015).

RODRÍGUEZ (1996) al investigar el comportamiento de cinco cepas de *Pleurotus ostreatus* en cuatro medios de cultivo sólido en laboratorio: agar con extracto de malta, agar con dextrosa y papa, agar con dextrosa sabouraud y agar con extracto de trigo, paja y malta; bajo condiciones de obscuridad total y a temperaturas de 28-30 °C, obtienen al medio agar con extracto de trigo, paja y malta, como la mejor porque ha mostrado mejores condiciones para el desarrollo de las cepas. Así mismo, al cultivar el micelio de una cepa comercial de *Pleurotus ostreatus* en cinco medios sólidos (agar Sabouraud dextrosa (ASD), agar papa dextrosa (PDA), agar extracto de malta (AEM), bactoagar (BA) y bactoagar ejote (BAE)), logra que la cepa crezca más rápido en BAE, donde el micelio ha crecido a una velocidad de 2.5-5.0 mm/día, caracterizándose por ser un micelio denso, arraigado, sumamente ramificado, vigoroso y con numerosas fíbulas.

HERNÁNDEZ y LÓPEZ (2009) al utilizar 5 cepas de *Pleurotus* nativas de la región del Sonocusco, Chiapas; evaluaron el crecimiento micelial en tres medios de cultivo: extracto de malta (EMA). Papa dextrosa agar (PDA) y Sabouraud (SA) (BIOXON). Los resultados obtenidos mostraron que la mayor velocidad de crecimiento se dio en EMA, con valores entre 18.14 mm/día.

ROSALES (2008) al estudiar el comportamiento de una cepa silvestre de *Pleurotus ostreatus* macro y microscópico en agar con extracto de malta bajo incubación a 29-30°C en oscuridad. Obtiene colonias densas, con micelio aéreo, textura algodonosa, con anillos concéntricos, al sembrar la cepa en agar con extracto de malta a 29-30°C y sometido a oscuridad. La velocidad de crecimiento fue de 8.5 mm/día.

Se denomina pudrición blanca (*white rot*) debido a que la madera una vez que es atacada por estos hongos mineralizan la lignina y sus derivados que le da a la madera un aspecto blanquecino (EATON y HALE, 1993), estos hongos realizan una función natural esencial en la conversión de lignina. En forma natural, estos hongos viven en los tejidos de la madera y se componen especialmente de tres biopolímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina.

Para el cultivo y crecimiento de los hongos en el laboratorio, comúnmente se emplean medios de cultivo sólidos con agar, los cuales actúan a manera de substrato al solidificar como una gelatina. El medio de cultivo que se utilice dependerá de la especie de hongo que se quiere cultivar, ya que cada especie tiene sus propios requerimientos nutricionales (GUZMÁN, 2000).

El desarrollo de biomasa fúngica sobre el cadmio y el colorante demuestran que *Pycnoporus sanguineus* y *Pleurotus ostreatus* produjeron enzimas que catalizaron la estructura aromática en estos compuestos, esto posiblemente debido a la acción conjunta de lignino-peroxidasa (LiP) y manganeso-peroxidasa (MnP) de acuerdo a lo indicado por (CHÁVEZ-LÓPEZ *et. al.*, 2005) al demostrar la actividad de la Lacasa en la degradación del hidrocarburo aromático policíclico fenantreno en solamente tres días de actividad.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

3.1.1. Ubicación política

La investigación se realizó en el laboratorio de Micología y Tecnología de la Propagación de la Facultad de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, ubicado en el Distrito Rupa Rupa, Provincia de Leoncio Prado, Región Huánuco.

3.1.2. Ubicación geográfica

Las muestras de los fungi se extrajeron del Jardín Botánico, que está ubicado en las coordenadas geográficas (Longitud Oeste: 76° 00' 17" y latitud Sur: 9° 18' 18") y del Bosque Reservado de la Universidad Nacional Agraria de la Selva (BRUNAS) cuya ubicación geográfica esta entre los 8° 22' 15" Y 10° 28' 56" latitud Sur y los 74° 29' 35" Y 77° 18' 53" de Longitud Oeste del meridiano de Gremwich, ambos a una altitud de 660 m.s.n.m.

3.1.3. Ecología y clima

Ecológicamente, según la clasificación de zonas de vida y el diagrama bioclimático de (HOLDRIDGE, 1987), Tingo María se encuentra en la formación vegetal bosque muy húmedo Pre-montano Tropical bmh-PT. El clima

es variable, con una precipitación anual promedio de 3328.9 mm, las mayores precipitaciones se producen entre los meses de septiembre a abril y alcanza un máximo en el mes de febrero con un promedio mensual de 608.4 mm.

3.2. Materiales y equipos

3.2.1. Material biológico

Especímenes de hongos de pudrición blanca: *Ganoderma applanatum*, *Pycnoporus sanguineus*, *Schizophyllum commune* y *Pleurotus ostreatus*.

3.2.2. Equipos y herramientas de laboratorio

Cámara de flujo laminar, autoclave, estufa, balanza electrónica de 0.01 de precisión, estereoscopio, microscopio, mechero, pipeta, placas Petri, cámara de incubación, bagueta y vaso de precipitado.

3.2.3. Insumos de laboratorio

Alcohol de 96°, agua destilada, ceftriaxona, hipoclorito de sodio, medio de cultivo de Agar Papa Dextrosa y Agar Extracto de Malta, papel filtro, tapones de algodón.

3.2.4. Reactivos y metales

Medios de cultivo, agar papa dextrosa (PDA), agar extracto de malta (AEM) envasado con presentación comercial de 500 gramos. Se utilizó como metales pesados cobre (Cu) y zinc (Zn), a concentraciones de 10 mg/L, 30 mg/L y 50 mg/L.



Figura 2. Medios de cultivo, a) Agar Extracto de Malta, b) Agar Papa Dextrosa

3.3. Metodología

3.3.1. Preparación de medio de cultivo

Los medios de cultivo que se utilizaron fueron agar papa dextrosa (APD) y agar extracto de malta (AEM).

Para preparar un litro de medio de agar papa dextrosa y agar extracto de malta se utilizaron 39 y 50 gramos de medio comercial respectivamente, en cada caso ambos medios de cultivo fueron preparados por separado en un vaso de precipitado removiendo constantemente con una bagueta para homogeneizar y diluir en medio hasta hervir por 10 minutos aproximadamente, de manera práctica hasta que el medio cambie de color a un tono más transparente.



Figura 3. Medio de cultivo agar papa dextrosa autoclavado (lado izquierdo) y agar extracto de malta (lado derecho)

3.3.2. Plaqueado de los medios

Una vez preparado los medios de cultivo agar papa dextrosa (PDA) y agar extracto de malta (AEM), estos fueron esterilizados en un autoclave a 15 Lb de presión, 121 °C durante 15 minutos, para luego llevarlos a la cámara de flujo laminar; y con todos los demás materiales a utilizarse se procedió a esterilizar con rayos ultravioleta por 15 minutos. Seguidamente, antes de realizarse el plaqueado de los medios de cultivo (PDA) y (AEM) se agregaron 0,3 gramos del antibiótico ceftriaxona, luego fue homogeneizado moviendo los matraces con la bagueta, posteriormente se procedió al plaqueado respectivo en la cámara de flujo laminar para evitar el riesgo de contaminación.



Figura 4. Plaqueado de los medios de cultivo PDA y AEM

3.3.3. Colección y descripción

Los especímenes de hongos fueron colectados del Bosque Reservado y Jardín Botánico de la Universidad Nacional Agraria de la Selva - Tingo María. Durante la colección se hicieron las anotaciones generales e información de la zona de colección, así como las observaciones de cada muestra referido a sus características externas (Anexo 1).

Cada muestra ha sido codificada, fotografiada y empacada in situ para su traslado al laboratorio. Parte de las muestras fueron secadas a estufa por un periodo de tiempo de 24 a 72 horas dependiendo del espécimen y a una temperatura de 60 grados centígrados (RYVARDEN, 2007; ROBLEDO, 2006), esto para conservar en buen estado las muestras. Asimismo, la identificación

genérica y específica, se ha realizado por medio de comparación con fotografías del catálogo “Hongos de Allpahuayo–Mishana” (ESPINOZA *et al.*, 2006). Las especies descritas son: *Ganoderma applanatum*, *Pycnoporus sanguineus*, *Schizophyllum commune* y *Pleurotus ostreatus*.

3.3.4. Desinfección y siembra

Cada uno de los fungi en estado fresco elegidos para el aislamiento fueron limpiados y seccionados en pedazos de aproximadamente 0.5 x 0.5 cm, inmediatamente se procedió a desinfectar el inóculo de acuerdo al protocolo recomendado por (CÓRDOVA, 2010) y (RUIZ, 1990), utilizando hipoclorito de sodio (NaOCl) en una proporción de 1:10 en agua destilada y por un periodo de tiempo de 1 minuto y tres enjuagues en agua destilada estéril, seguidamente las secciones esterilizadas fueron secadas con papel filtro.

Cumplida la desinfección, éstas fueron sembradas en el centro de cada placa de 90 mm de diámetro con los medios agar papa dextrosa y agar extracto de malta, finalmente las cajas Petri fueron selladas con parafilm y rotuladas para dejar incubándose a temperatura ambiente hasta apreciar desarrollo micelial. Toda esto se realizó en la cámara de flujo laminar.

Las placas sembradas fueron depositadas en una incubadora con una temperatura de 27°C y en oscuridad para el lograr el crecimiento micelial. Con un período de tiempo aproximado entre 8 y 15 días, el micelio de los

cuatro fungi sembrados ha cubierto el área total de las placas Petri de 90 mm de diámetro.

3.3.5. Preparación de caldo Saboraud y medio mínimo de sales

Para preparar 1 litro de caldo Saboraud se ha requerido los siguientes compuestos: dextrosa (40 g), peptona (10 g) y agua destilada (1 L). Este medio ha sido empleado para la activación de las cepas, por lo que los hongos requieren nutrientes bastantes ricos en carbono.

Cuadro 1. Componentes para la preparación de 1 litro de medio mínimo

Compuestos	Cantidad
Fosfato de potasio dibásico	5.23 gramos
Fosfato de potasio monobásico	1.91 gramos
Sulfato de magnesio	0.09 gramos
Sulfato de amonio	1 gramos
Trozo de elemento (*)	1 mililitro
Agua destilada	1000 mililitros

Cuadro 2. Compuestos para la preparación de 1 litro de trozo de elemento (*)

Compuestos	Cantidad
Ácido bórico	20 miligramos
Sulfato de zinc	30 miligramos
Sulfato de cobre	1 miligramos
Molibdato de sodio	3 miligramos

Sulfato de hierro	10 miligramos
Sulfato de magnesio	2.6 miligramos
Agua destilada	1000 mililitros

3.3.6. Activación de los fungi

Los matraces conteniendo el caldo Sabouraud Glucosado fueron esterilizados en el autoclave, luego se dejó enfriar para agregar el antibiótico ceftriaxona (0.2 g/L), seguidamente se repicó el micelio axénico de los fungi aislados en las placas Petri. Finalmente se dejó incubar por 5 días a temperatura ambiente.

Los fungi necesitan nutrientes ricos en carbono, por esta razón se escogió el caldo Saboraud, debido a su alto contenido de dextrosa.



Figura 5. Caldo Sabouraud esterilizado para ser repicado con micelio de los hongos en estudio.

3.3.7. Prueba de desarrollo a distintas concentraciones de Cu y Zn

Luego de tener el Medio Mínimo de Sales Minerales (MMSM) para la inducción se añadió glucosa (0.25 g/L), extracto de levadura al 0.1%; adicionado con cobre (10 mg/L, 30 mg/L y 50 mg/L) y zinc (10 mg/L, 30 mg/L y 50 mg/L). Se esterilizó en el autoclave y se dejó enfriar para agregar ceftriaxona a una dosis de 0.2 g/L. Seguidamente se repartió la solución en los matraces esterilizados y posteriormente se inoculó 7.5 mL del caldo Saboraud en activación de las cepas de los fungi a cada matraz.

Para finalizar, se dejó incubar durante 14 días a temperatura ambiente para determinar la biomasa fúngica (micelio) y la eficiencia de remoción de los fungi ante la presencia de los metales pesados inducidos en el medio acuoso.



Figura 6. Prueba de desarrollo a distintas concentraciones de Cu y Zn (a) Envases con MMSM con las respectivas concentraciones de Cu y Zn, (b) esterilizando en el autoclave, (c) matraces inoculados con el micelio de cada hongo en las distintas concentraciones de los metales.

3.3.8. Extracción micelial fúngica y lectura en el espectrofotómetro

Después de 14 días de incubación, se procedió a extraer la biomasa fúngica por medio de centrifugación y filtrado de sobrenadante, seguidamente se secó en el horno hasta obtener una temperatura constante; posteriormente se pesó para conocer la biomasa del micelio en cada concentración de cobre y zinc. Finalmente, una muestra de cada solución filtrada se sometió a la lectura del espectrofotómetro para conocer la capacidad de remoción de cobre y zinc.



Figura 7. Extracción micelial fúngica, (a) Centrifugado del medio para separar el micelio (b) filtrado de la sobrenadante

3.4. Datos a registrar

3.4.1. Crecimiento radial de la biomasa micelial

La evaluación se realizó en forma diaria con una regla milimetrada, tomando la medida desde el centro de cada placa hasta el borde, es decir; se midieron hasta que el micelio cubrió el área total de la placa.

3.4.2. Características morfológicas de los fungi aislados en medios nutritivos

Se realizó una evaluación de tipo descriptivo con los cuatro hongos escogidos para la investigación, considerando las características cualitativas del micelio de cada fungi.

3.4.3. Densidad celular fúngica

La densidad celular fue determinada por la medida del peso seco de la biomasa celular (micelio), para ello la biomasa se separó del medio líquido por centrifugación a 3,500 rpm por 15 minutos, inmediatamente filtrada con papel filtro de peso conocido y sometido el papel a la estufa con 80 °C hasta obtener peso constante. Los resultados son expresados en miligramos por mililitro (LÓPEZ, 1998).

$$Biomasa \left(\frac{mg}{ml} \right) = X_2 - X_1$$

X₁: Peso del papel solo;

X₂: Peso del papel con biomasa

3.4.4. Concentración de cobre y zinc

El sobrenadante (efluente) en el cual se encontraría el cobre y el zinc en solución, fueron almacenados en envases de 70 mL con tapa y puestos en refrigeración (4 a 8 °C) hasta la realización de las pruebas cuantitativas de la presencia de cobre y zinc, por medio de la técnica de absorción atómica en

llama con el espectrofotómetro, esta técnica consiste en la excitación de los electrones asociados al núcleo atómico, dicha excitación absorbe energía a una longitud de onda específica.

3.4.5. Eficiencia de remoción

Se calculó mediante una correlación porcentual entre la concentración inicial y final del cobre y zinc en el medio acuoso presente en los matraces, según cada tratamiento evaluado (MARCOVECCHIO y MORENO, 1991).

$$E_r = \frac{C_i - C_f}{C_i} \times 100$$

Dónde:

E_r = eficiencia de remoción (%)

C_i = Concentración inicial (g/mL)

C_f = Concentración final (g/mL).

3.5. Diseño experimental

Se consideró 4 hongos (H1: *Ganoderma applanatum*, H2: *Pycnoporus sanguineus*, H3: *Schizophyllum commune* y H4: *Pleurotus ostreatus*), 2 contaminantes (Cu: cobre y Zn: Zinc), 3 concentraciones (Co1: 10 mg/L, Co2: 30 mg/L y Co3:50 mg/L), con tres repeticiones.

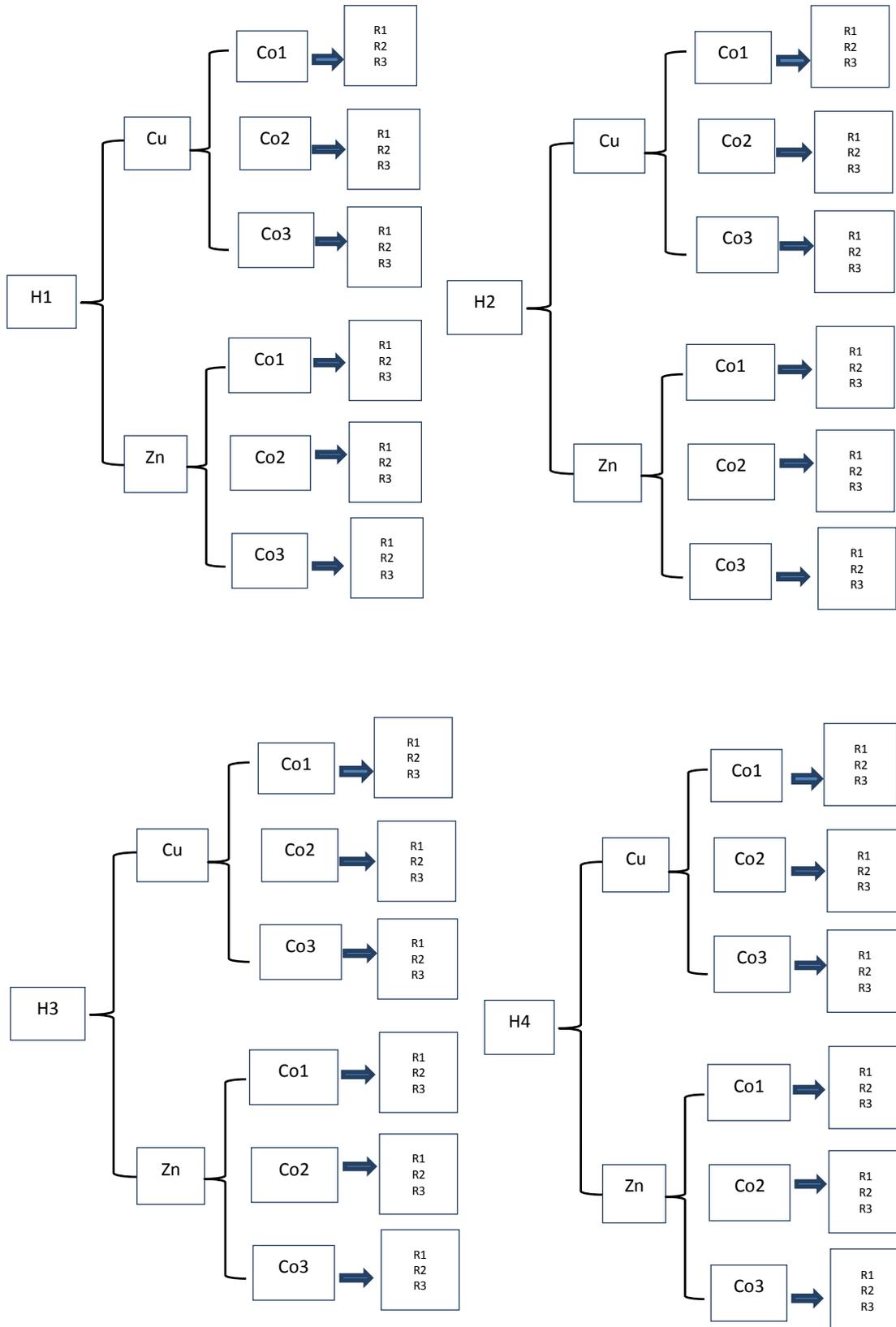


Figura 8. Esquema experimental

Tratamientos en estudio

Cuadro 3. Descripción de los tratamientos en la remoción de cobre y zinc

Tratamientos	Contaminante	Concentración	Repeticiones
		ppm	
T1	Testigo	0 mg/L	1
T2	Cobre cc1	10 mg/L	3
T3	Cobre cc2	30 mg/L	3
T4	Cobre cc3	50 mg/L	3
T5	Testigo	0 mg/L	1
T6	Zinc cc1	10 mg/L	3
T7	Zinc cc2	30 mg/L	3
T8	Zinc cc3	50 mg/L	3

3.6. Variables

- **Variables independientes:** concentración inicial del cobre y zinc, capacidad de los fungi ligninolíticos.
- **Variable dependiente:** capacidad de remoción.

3.7. Análisis estadístico

Se utilizó el modelo estadístico diseño completamente al azar (DCA) con arreglo 4 x 2 x 3, con tres repeticiones.

Cuadro 4. Análisis de Varianza (ANVA)

Fuente de variación	GL	SC	CM	Fc	Significancia
Tratamientos	t - 1	ST- e	SCtrat/GLtrat	CMtrat/CMe	Fc > Ft
Error	t(r-1)	SCT-SCtrat	SCerror/GLe		
TOTAL	t.r-1				

Modelo aditivo lineal

$$Y_j = \mu + T_i + E$$

Dónde:

Y_j : Variable resultado u observación cualquiera

μ : Media general

T_i : Efecto del i-ésimo tratamiento

E : Efecto del error experimental

IV. RESULTADOS

4.1. Aislamiento y determinación de características morfológicas de cuatro fungi de pudrición blanca colectados en Tingo María

Cuadro 5. Especímenes de fungi colectados y aislado

Nº	Código	N. Científico	Familia
1	FTM-203	<i>Ganoderma applanatum</i> (Pers.) Pat.	GANODERMATACEAE
2	FTM-212	<i>Pycnoporus sanguineus</i> (L.) Murril	POLYPORACEAE
3	FTM-216	<i>Schizophyllum commune</i> Fries	SCHIZOPHYLLACEAE
4	FTM-220	<i>Pleurotus ostreatus</i> (Jacq. ex Fr) Kumm	PLEUROTACEAE

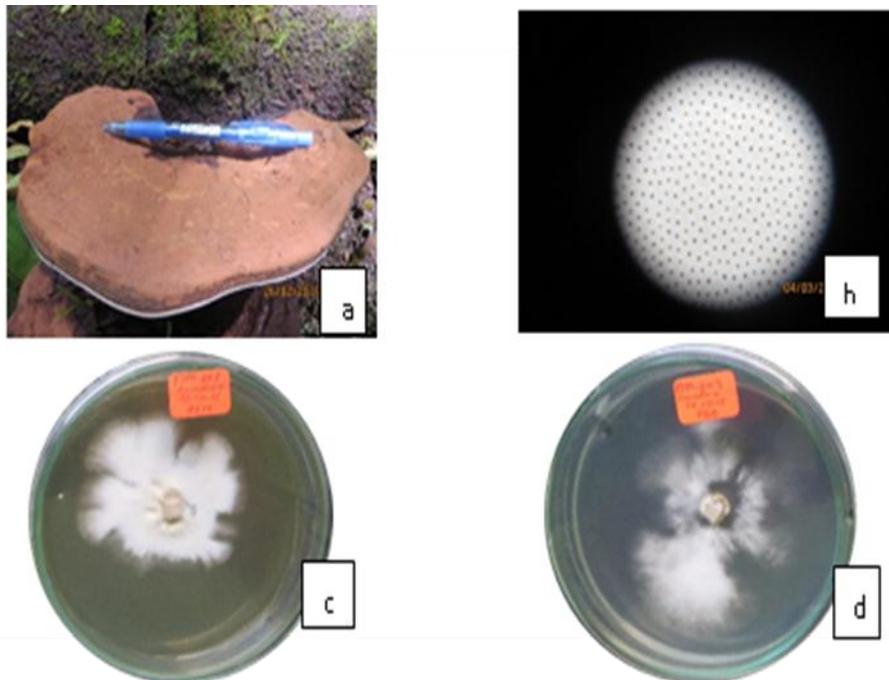


Figura 9. *Ganoderma applanatum* (Pers.) Pat. (a) basidiocarp, (b) poros circulares pequeños vistos al estereoscopio, (c y d) micelio crecimiento en forma irregular de color blanco en ambos medios de cultivo agar extracto de malta y agar papa dextrosa.

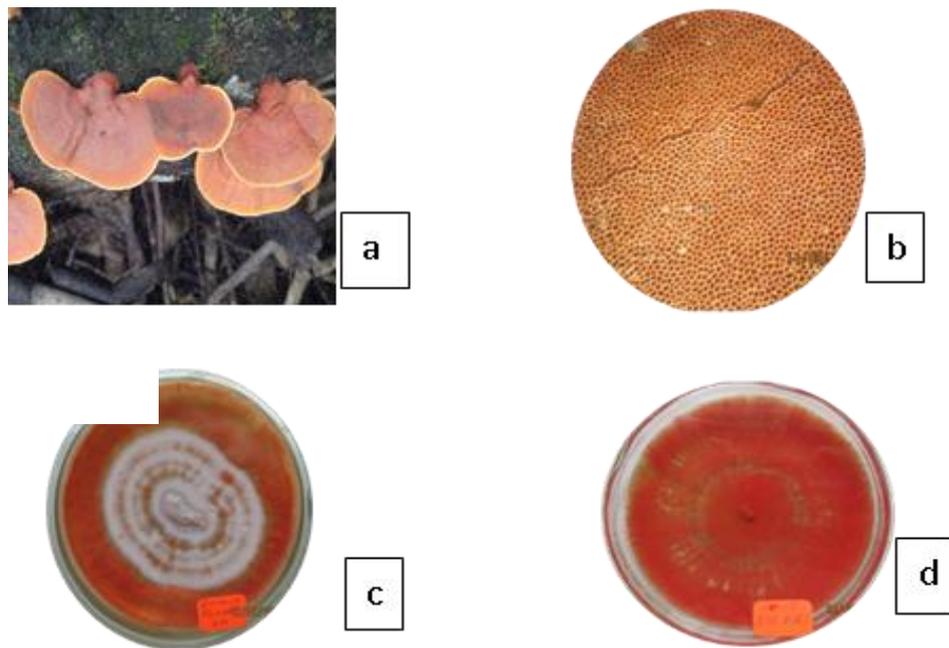


Figura 10. *Pycnoporus sanguineus* (L.) Murril (a) píleo e himenóforo, (b) poros vistos al estereoscopio (c) micelio en medio agar extracto de malta (d) micelio en medio agar papa dextrosa.



Figura 11. *Schizophyllum commune* Fries (a) láminas en el himenóforo (b) píleo o sombrero del basidiocarpo (c) micelio en medio agar papa dextrosa (d) micelio en medio agar extracto de malta.

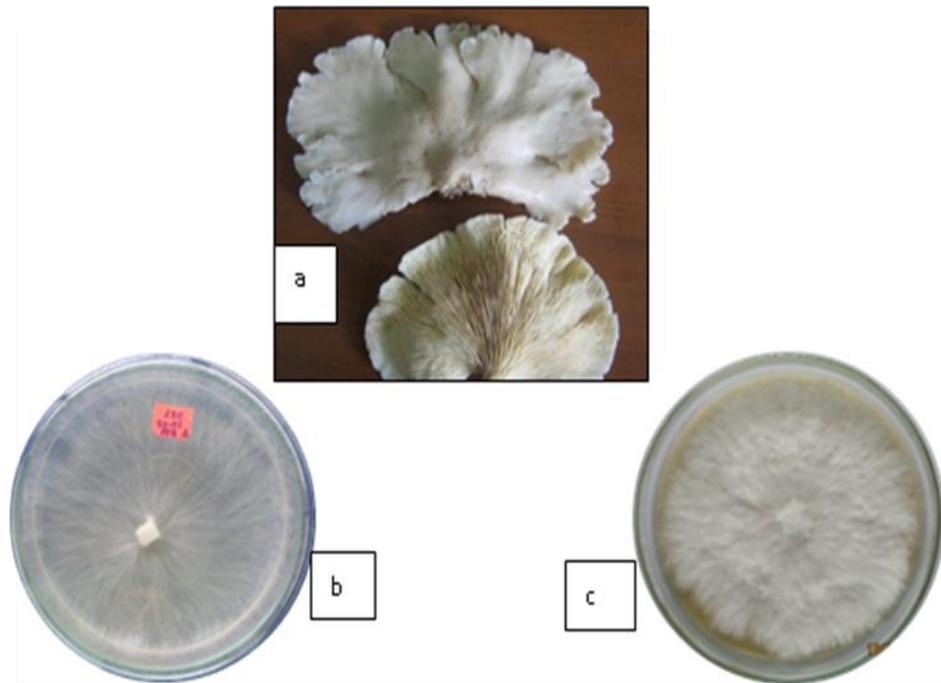


Figura 12. *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr) Kumm (a) sombrero o píleo (b) micelio en medio PDA (c) micelio en medio AEM.

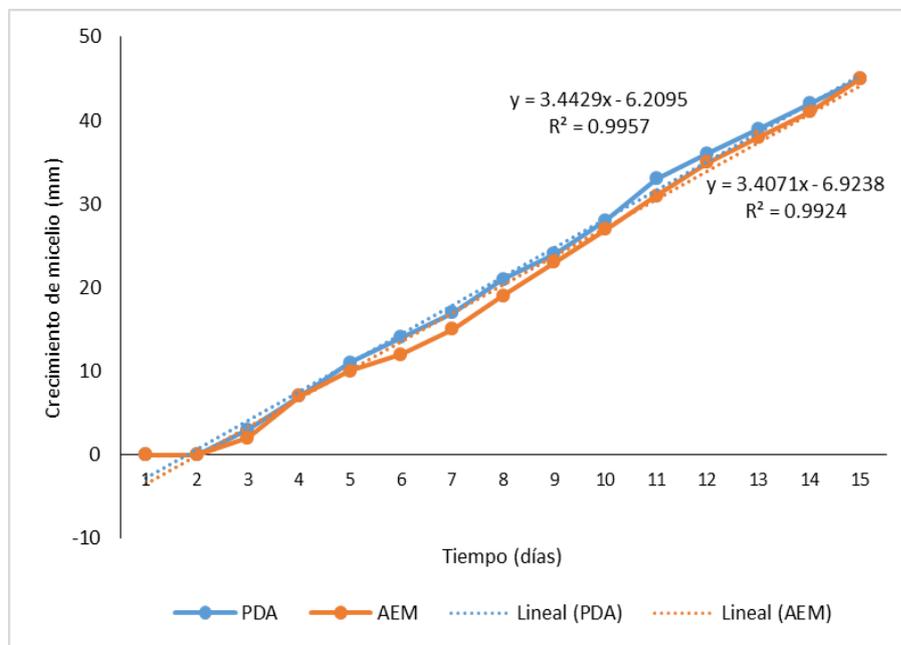


Figura 13. Curva de crecimiento radial de micelio de *Ganoderma applanatum* (mm) en placas Petri de 90 mm de diámetro.

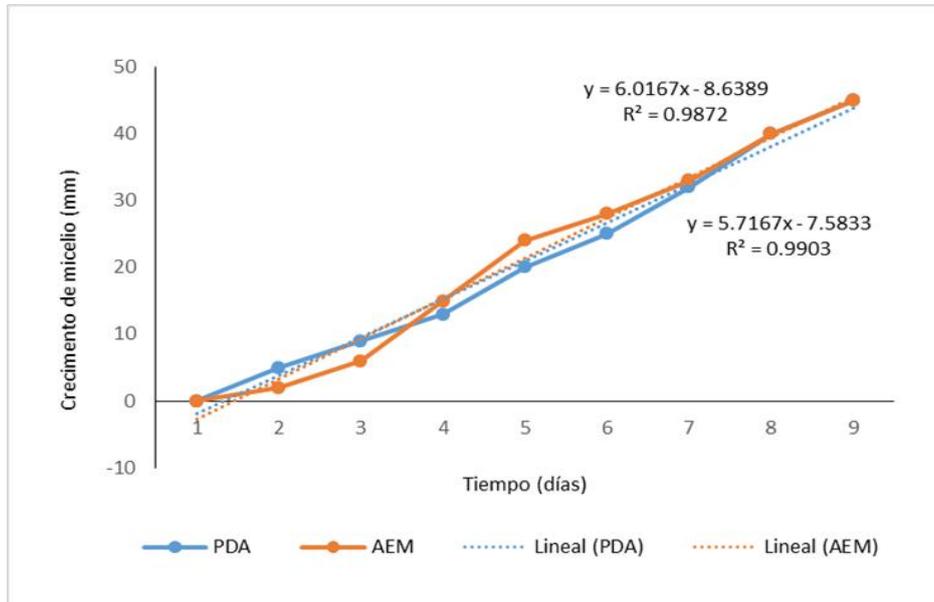


Figura 14. Curva de crecimiento radial de micelio de *Pycnoporus sanguineus* (mm) en placas Petri de 90 mm de diámetro.

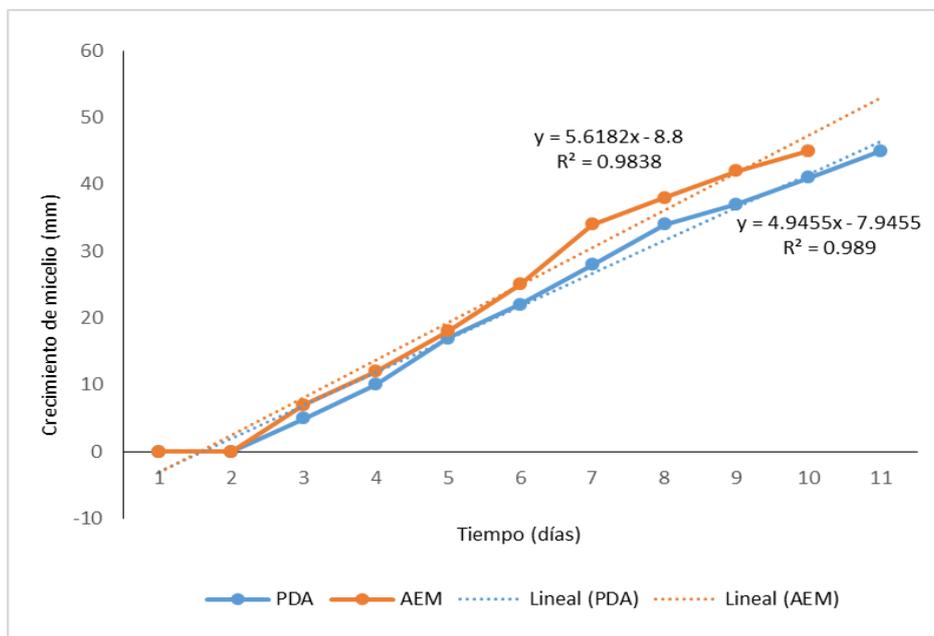


Figura 15. Curva de crecimiento radial de micelio de *Schizophyllum commune* (mm) en placas Petri de 90 mm de diámetro.

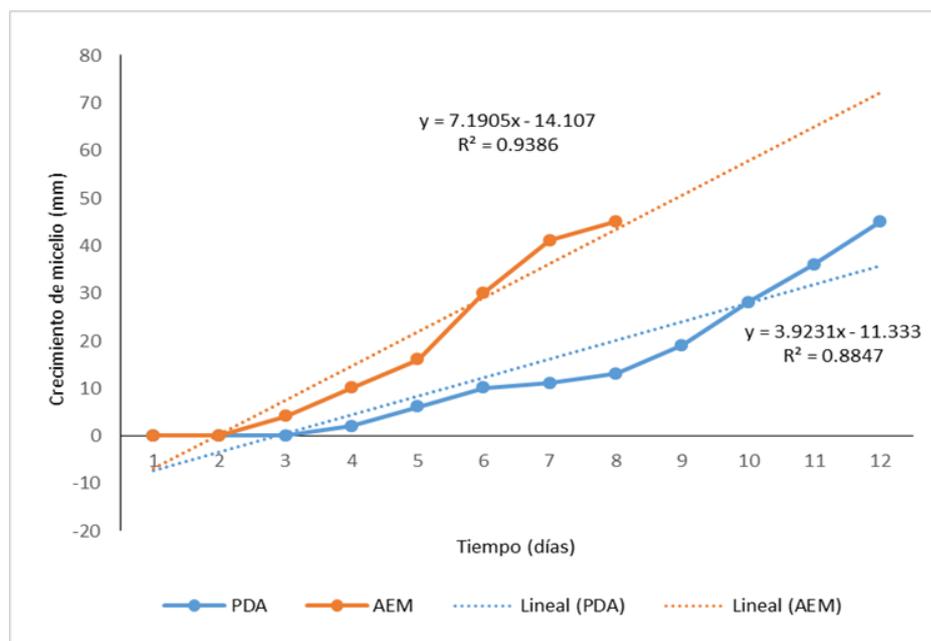


Figura 16. Curva de crecimiento radial de micelio de *Pleurotus ostreatus* (mm) en placas Petri de 90 mm de diámetro.

Cuadro 6. Características morfológicas de los fungi aislados en medios nutritivos

Características morfológicas	Código	<i>Ganoderma applanatum</i>		<i>Pycnoporus sanguineus</i>		<i>Schizophyllum commune</i>		<i>Pleurotus ostreatus</i>	
		PDA	AEM	PDA	AEM	PDA	AEM	PDA	AEM
Tipo de crecimiento	Homogéneo			x	x		x	x	x
	Irregular	x	x			x			
	Ralo								
	C/anillos de crecimiento				x				
Textura	Algodonoso								
	Aborlada					x			
	Venosa						x	x	
	Aterciopelada			x	x				x
	Cerosa	x	x						

	Blanco	1	x	x		x			
	Blanquino	2					x	x	x
Color	Amarillento	3							
	Rosado a rojizo	4			x	x			
	Marron a oscuro	5							
	Abundante	1							
Micelio	Regular	2				x	x	x	x
aéreo	Escaso	3			x	x			
	Ausente	4	x	x					

Se aprecia los aislamientos de los fungi *Ganoderma applanatum*, *Pycnoporus sanguineus*, *Schizophyllum commune* y *Pleurotus ostreatus* debidamente codificados (Cuadro 5, Figuras 9 al 12), la curva de crecimiento de cada espécimen (Figuras 13 al 16), y el crecimiento radial diario de micelio. Entre 8 y 15 días fue el tiempo transcurrido para que el micelio cubra el total de área de las placas de 90 mm de diámetro. Siendo *P. ostreatus* el que cubrió el área de la placa en solo ocho días después de sembrado el inóculo, a diferencia de *G. applanatum* que ha requerido 15 días (Figura13).

Referente a las características morfológicas del micelio de los fungi aislados, se ha considerado el tipo de crecimiento, es decir; si es homogéneo, regular, ralo, y si presenta o no anillos de crecimiento; la textura, considerado si es algodonoso, aborlada, venosa, aterciopelada, cerosa; el color que presenta el micelio y la presencia o no de micelio aéreo. Estas características influyen grandemente para demostrar la robustez y demás características que ayudan a definir para seleccionar al fungi para otras pruebas.

En ambos medios de cultivo, se ha notado buen crecimiento y desarrollo del micelio de los fungi aislados. *Schizophyllum commune* en agar papa dextrosa tienen un crecimiento chispeado, mientras que en agar malta es bastante compacto. *Pycnoporus sanguines*, presenta un crecimiento micelial inicialmente de aspecto ceroso en ambos medios de cultivo, posteriormente se torna más blanco y algodonoso en medio extracto de malta, y entre los 9 a 10 días se notan líneas concéntricas de color blanco, tornándose después de algunos días de color rosado, y rojo en otros casos. *Ganoderma applanatum*, crece con textura cerosa en medio agar papa dextrosa, mientras que el micelio es más homogéneo, algodonoso y vigoroso en agar extracto de malta. *Pleurotus ostreatus*, crece bastante bien en ambos medos de cultivo.

4.2. Densidad celular fúngica en medio acuoso con cobre y zinc

4.2.1. Densidad celular fúngica en medio acuoso con cobre

Cuadro 7. Análisis de varianza (alfa=0.05), de la densidad celular fúngica en medio acuoso con cobre

F.V.	SC	g. l.	CM	F	p-valor
Tratamientos	20.05	3	6.68	20.39	<0.0001
Hongo	12.73	3	4.24	12.95	<0.0001
Tratamientos*Hongo	7.44	9	0.83	2.52	0.0260
Error	10.49	32	0.33		
Total	50.71	47			

R² = 0.79;

CV= 24.92%

Cuadro 8. Prueba de Tukey (alfa=0.05), de densidad celular fúngica de las interacciones tratamientos*hongos

Tratamientos	Hongo	Medias (g/L)				
0 mg/L	<i>P. sanguineus</i>	3.91	a			
0 mg/L	<i>P. ostreatus</i>	3.91	a			
50 mg/L	<i>P. sanguineus</i>	3.33	a	b		
50 mg/L	<i>P. ostreatus</i>	3.24	a	b		
0 mg/L	<i>S. commune</i>	2.84	a	b	c	
0 mg/L	<i>G. applanatum</i>	2.58	a	b	c	d
10 mg/L	<i>P. ostreatus</i>	2.31	a	b	c	d
10 mg/L	<i>G. applanatum</i>	2.22	a	b	c	d
30 mg/L	<i>P. ostreatus</i>	2.09	a	b	c	d
10 mg/L	<i>P. sanguineus</i>	2		b	c	d
30 mg/L	<i>G. applanatum</i>	1.87		b	c	d
50 mg/L	<i>G. applanatum</i>	1.82		b	c	d
10 mg/L	<i>S. commune</i>	1.33			c	d
30 mg/L	<i>P. sanguineus</i>	1.29			c	d
30 mg/L	<i>S. commune</i>	1.02				d
50 mg/L	<i>S. commune</i>	0.98				d

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Para el análisis estadístico del comportamiento de los cuatro fungi se plantearon las hipótesis correspondientes:

H₀: $\mu F_1 = \mu F_2 = \mu F_3 = \mu F_4$ y **H_a:** existe una μ o media diferente

En el ANVA, para el caso de densidad celular fúngica si vemos las interacciones tratamientos*hongos p valor = $0.0260 < \alpha = 0.05$, lo que implica el rechazo de H₀, por lo tanto, existe diferencia estadística significativa entre las interacciones hongo/tratamientos en referencia al promedio de crecimiento y

generación de densidad celular en las distintas concentraciones de cobre; lo que significa que, no todos los hongos investigados son eficientes para este caso.

Cuadro 9. Prueba de Tukey (alfa = 0.05), de la densidad celular en medio acuosa de cobre, con respecto al tipo de fungi de pudrición blanca.

Hongo	Medias (g/L)			
<i>P. ostreatus</i>	2.89	a		
<i>P. sanguineus</i>	2.63	a	b	
<i>G. applanatum</i>	2.12		b	c
<i>S. commune</i>	1.54			c

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

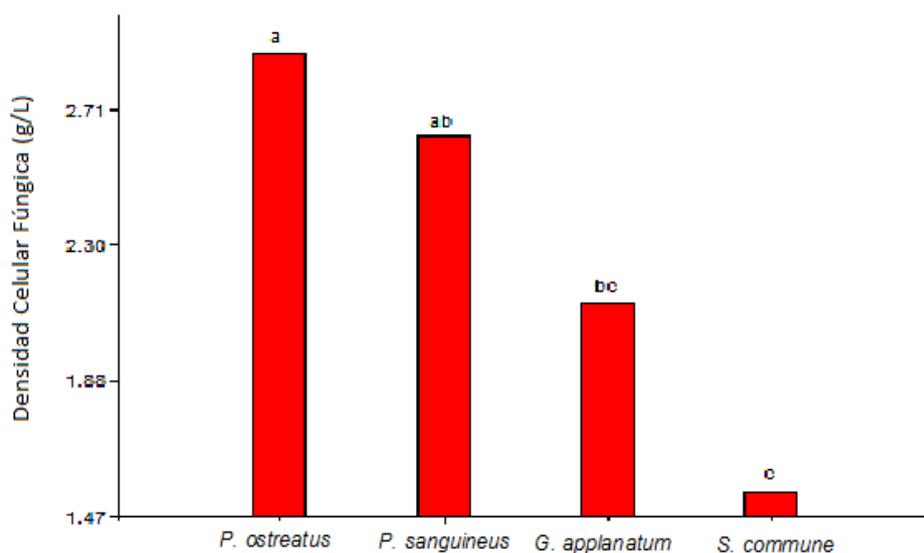


Figura 17. Densidad celular en medio acuoso con cobre y el tipo de fungi de pudrición blanca.

Cuadro 10. Prueba de Tukey ($p= 0.05$), de la densidad celular fúngica en medio acuoso, con respecto a las concentraciones de cobre.

Tratamiento	Medias (g/L)			
0 mg/L	3.31	a		
50 mg/L	2.34		b	
10 mg/L	1.97		b	c
30 mg/L	1.57			c

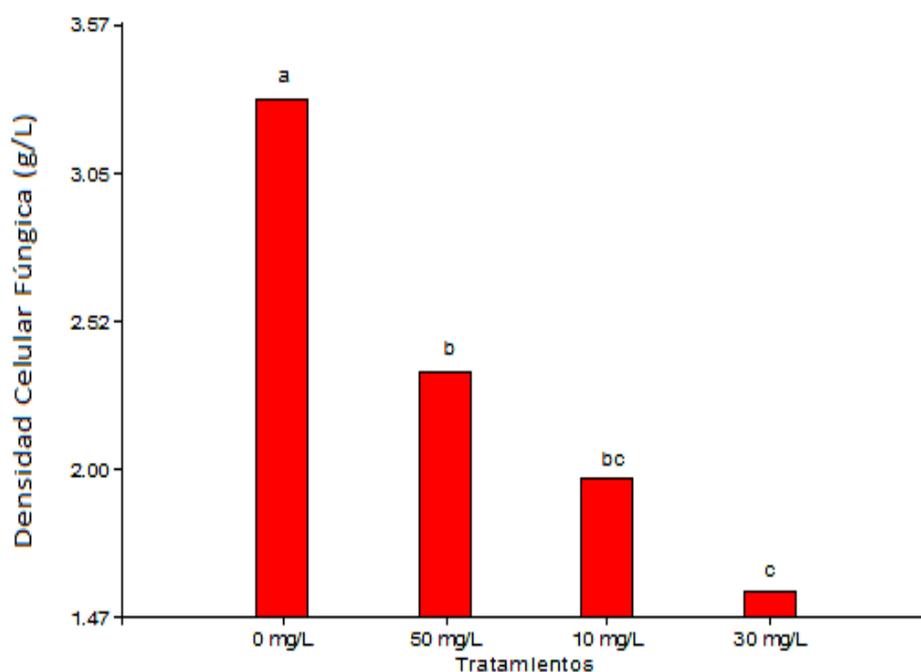


Figura 18. Densidad Celular fúngica en medio acuoso con cobre en las concentraciones (tratamientos)

En referencia a la densidad celular fúngica con respecto al elemento cobre, se aprecia en el análisis de varianza (Cuadro 7) y prueba de Tukey (Cuadro 8), así como en la Figura 18; donde existe diferencia estadística entre los fungi, entre las concentraciones y entre la interacción fungi-concentraciones, donde *Pleurotus ostreatus* muestra mayor promedio de densidad celular fúngica a concentraciones de 0, 10, 30 y 50 mg/L, seguido de

Pycnoporus sanguineus a concentraciones de 0, 10 y 50 mg/L; con respecto a los demás tratamientos. En consecuencia, *P. ostreatus* y *P. sanguineus* (Cuadro 9), son posiblemente los fungi con mayor potencial para biodegradar cobre, en consecuencia; es necesario plantear investigaciones considerándose mayores concentraciones del elemento cobre.

4.2.2. Densidad Celular fúngica en medio acuoso con zinc

Cuadro 11. Análisis de varianza (alfa=0.05), de la densidad celular fúngica en medio acuoso con zinc.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Tratamientos	0.09	3	0.03	25.32	<0.0001
Hongo	0.05	3	0.02	13.96	<0.0001
Tratamientos*Hongo	0.03	9	2.80E-03	2.39	0.034
Error	0.04	32	1.20E-03		
Total	0.2	47			

R²=0.81 CV: 20.65

Cuadro 12. Prueba de Tukey (alfa=0.05), de densidad celular fúngica de las interacciones tratamientos*hongos

Tratamientos	Hongo	Medias (g/L)					
0 mg/L	<i>P. ostreatus</i>	0.27	a				
0 mg/L	<i>P. sanguineus</i>	0.26	a	b			
0 mg/L	<i>G. applanatum</i>	0.22	a	b	c		
0 mg/L	<i>S. commune</i>	0.21	a	b	c		
10 mg/L	<i>P. sanguineus</i>	0.21	a	b	c		
50 mg/L	<i>P. ostreatus</i>	0.2	a	b	c	d	
30 mg/L	<i>P. ostreatus</i>	0.18	a	b	c	d	
30 mg/L	<i>P. sanguineus</i>	0.18	a	b	c	d	
10 mg/L	<i>P. ostreatus</i>	0.16		b	c	d	e

10 mg/L	<i>G. applanatum</i>	0.16	b	c	d	e
30 mg/L	<i>G. applanatum</i>	0.15	b	c	d	e
50 mg/L	<i>P. sanguineus</i>	0.14		c	d	e
10 mg/L	<i>S. commune</i>	0.12		c	d	e
50 mg/L	<i>S. commune</i>	0.1			d	e
50 mg/L	<i>G. applanatum</i>	0.06				e
30 mg/L	<i>S. commune</i>	0.06				e

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Para el análisis estadístico del comportamiento de los cuatro fungi se plantearon las hipótesis correspondientes:

H₀: $\mu F_1 = \mu F_2 = \mu F_3 = \mu F_4$ y **H_a:** existe una μ o media diferente

En el ANVA, para el caso de densidad celular fúngica si vemos las interacciones tratamientos*hongos p valor = $0.0340 < \alpha = 0.05$, lo que implica el rechazo de H₀, por lo tanto, existe diferencia estadística significativa entre las interacciones hongo/tratamientos en referencia al promedio de crecimiento y generación de densidad celular en las distintas concentraciones de zinc; lo que significa que, no todos los hongos investigados son eficientes para este caso.

Cuadro 13. Prueba de Tukey (alfa = 0.05), de la densidad celular en medio acuosa de zinc, con respecto al tipo de fungi de pudrición blanca.

Hongo	Medias (g/L)		
<i>P. ostreatus</i>	0.2	a	
<i>P. sanguineus</i>	0.2	a	
<i>G. applanatum</i>	0.15		b
<i>S. commune</i>	0.12		b

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

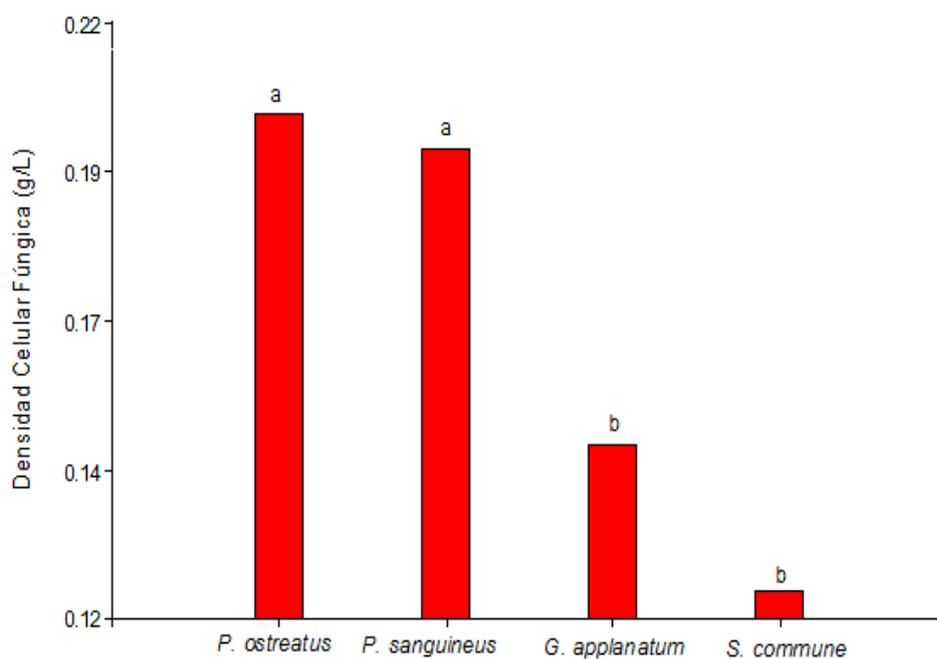


Figura 19. Densidad celular en medio acuosa de zinc con los fungi de pudrición blanca

Cuadro 14. Prueba de Tukey (alfa = 0.05), de la densidad celular en medio acuoso de zinc, con respecto a las concentraciones de zinc.

Tratamientos	Medias (g/L)	
0 mg/L	0.24	a
10 mg/L	0.16	b
30 mg/L	0.15	b
50 mg/L	0.12	b

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

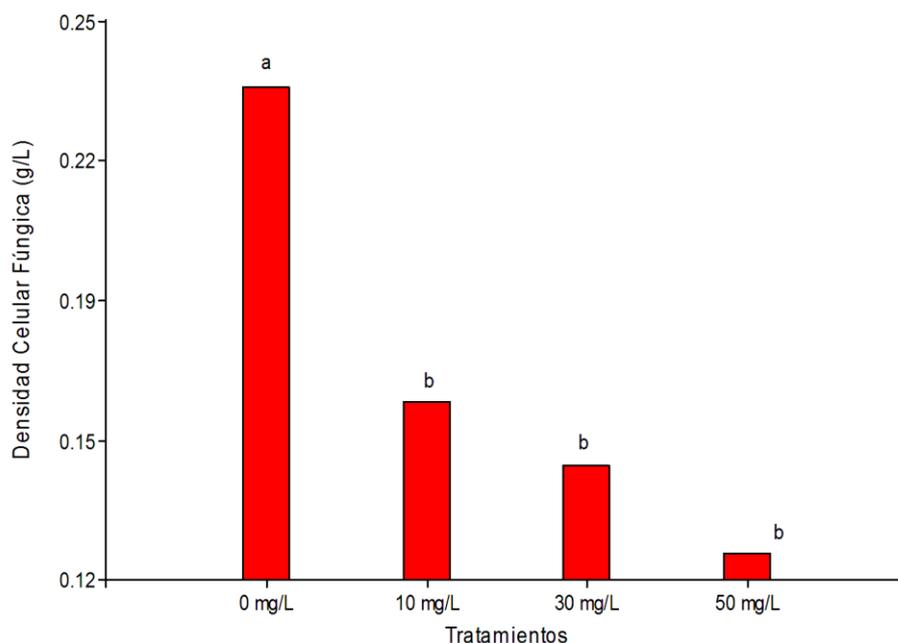


Figura 20. Densidad Celular fúngica en medio acuoso con zinc en las distintas concentraciones

La densidad celular fúngica obtenida con respecto a las concentraciones del elemento zinc (Cuadro 11) y prueba de Tukey (Cuadro 12), nos muestra que existe diferencia estadística entre los fungi, entre las concentraciones y entre las interacciones fungi-concentraciones. Con el tratamiento T0 (testigo), los cuatro fungi presentan mayor promedio de densidad celular fúngica, asimismo, se pudo observar respuesta con mayores promedios a 10, 30 y 50 mg/L por los fungi *Pleurotus ostreatus* y *Pycnoporus sanguineus*, con respecto a los demás tratamientos.

De igual modo como en el caso del cobre, *P. ostreatus* y *P. sanguineus* (Cuadro 13 y Figura 19), son posiblemente los fungi con mayor potencial para biodegradar zinc.

4.3. Eficiencia de remoción de los fungi en los medios acuosos

4.3.1. Capacidad de remoción de los fungi en medio acuoso con cobre

Cuadro 15. Análisis de varianza (alfa=0.05), de remoción de los fungi en medio acuoso con cobre.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Tratamientos	10.79	2	5.4	11.77	0.0003
Hongo	1.88	3	0.63	1.37	0.2767
Tratamientos*Hongo	64.39	6	10.73	23.41	<0.0001
Error	11	24	0.46		
Total	88.07	35			

R²=0.88

CV: 0.72

Cuadro 16. Prueba de Tukey (alfa=0.05), de remoción de los fungi en medio acuoso con cobre.

Tratamientos	Hongos	Medias (%)			
10 mg/L	<i>G. applanatum</i>	92.1	a		
10 mg/L	<i>P. sanguineus</i>	92.11	a		
30 mg/L	<i>P. ostreatus</i>	92.8	a	b	
50 mg/L	<i>P. ostreatus</i>	93.98	a	b	c
50 mg/L	<i>S. commune</i>	94.03	a	b	c
30 mg/L	<i>S. commune</i>	94.15		b	c
30 mg/L	<i>G. applanatum</i>	94.22		b	c
10 mg/L	<i>S. commune</i>	95.04			c d
30 mg/L	<i>P. sanguineus</i>	95.15			c d

50 mg/L	<i>G. applanatum</i>	95.78	c	d
10 mg/L	<i>P. ostreatus</i>	96.33		d
50 mg/L	<i>P. sanguineus</i>	96.77		d

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Para el análisis estadístico (Cuadro 16) referido al comportamiento de los cuatro fungi se plantearon las hipótesis correspondientes:

H₀: $\mu F_1 = \mu F_2 = \mu F_3 = \mu F_4$ **H_a:** existe una μ o media diferente

En el ANVA, para este caso de eficiencia de remoción en las interacciones tratamientos*hongos se aprecia que $p \text{ valor} = 0.0001 < \alpha = 0.05$, en consecuencia se rechaza H₀, lo que implica que existe diferencia estadística significativa entre las interacciones hongo/tratamientos en el comportamiento de los cuatro fungi en cuanto a la eficiencia de remoción del cobre.

Cuadro 17. Prueba de Tukey (alfa = 0.05), de remoción de los fungi en medio acuoso con cobre, con respecto al tipo de fungi de pudrición blanca.

Hongo	Medias (%)	
<i>G. applanatum</i>	94.03	a
<i>P. ostreatus</i>	94.37	a
<i>S. commune</i>	94.41	a
<i>P. sanguineus</i>	94.68	a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

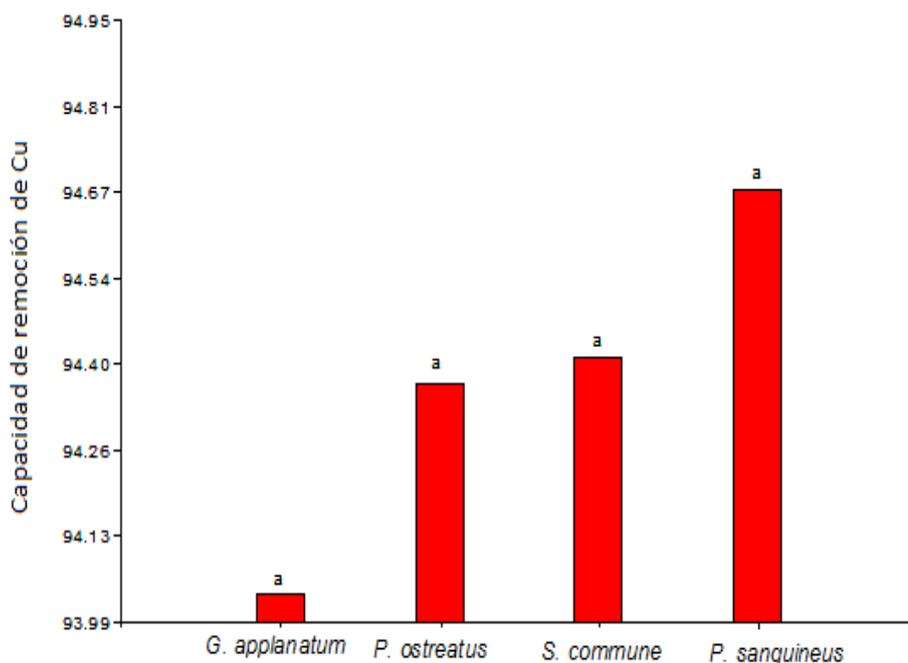


Figura 21. Eficiencia de remoción en medio acuoso con cobre para los fungi de pudrición blanca.

Cuadro 18. Prueba de Tukey (alfa = 0.05), de remoción de los fungi en medio acuoso con cobre, con respecto a las concentraciones de cobre.

Tratamientos	Medias (%)	
10 mg/L	93.9	a
30 mg/L	94.08	a
50 mg/L	95.14	b

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

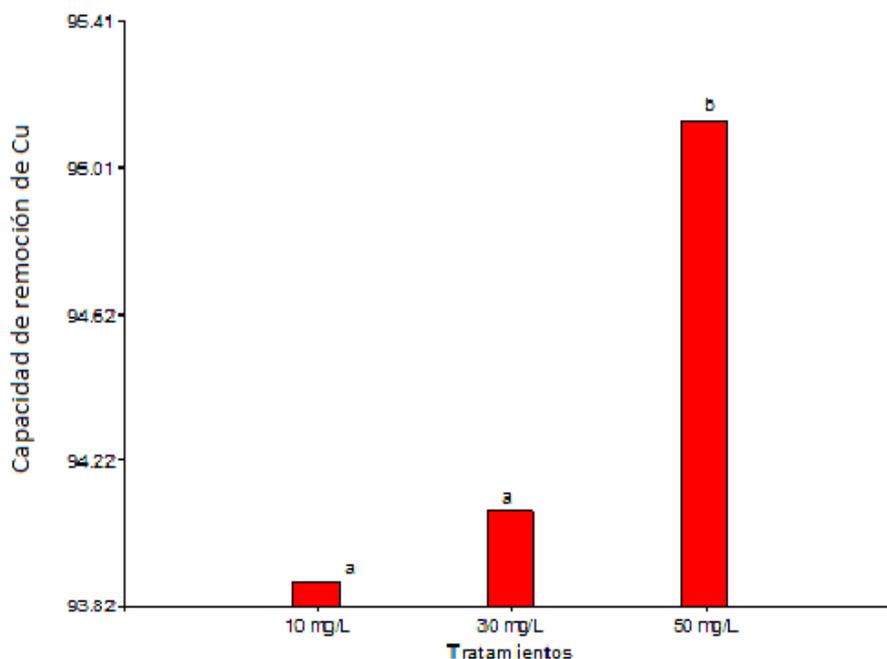


Figura 22. Eficiencia de remoción de los fungi en medio acuoso con cobre, respecto a las concentraciones de cobre.

La eficiencia de remoción de los fungi en medio acuoso con el elemento cobre (Cuadros 15 y 16) y, muestra que existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos y entre las interacciones tratamientos/hongos; más no así entre los fungi, porque todos mostraron promedios significativos de remoción en alguna de las concentraciones de cobre en prueba, cuyos promedios van entre 95.04 a 96.77 % de remoción. El orden de importancia de acuerdo a los promedios de remoción de cobre, con respecto al tipo de fungi, se indican a *P. sanguineus*, *S. commune*, *P. ostreatus* y *G. applantum* (Cuadro 17, Figura 21). Asimismo, referente a las concentraciones de cobre usadas, la concentración de 50 mg/L fue el que ha

obtenido mayor promedio de remoción (95.14) con respecto a los demás, tal como se aprecia en el Cuadro 18 y Figura 22.

4.3.2. Eficiencia de remoción de los fungi en medio acuoso con zinc

Cuadro 19. Análisis de varianza (alfa=0.05), de remoción de los fungi en medio acuoso con zinc.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Tratamientos	97.43	2	48.72	174.31	<0.0001
Hongo	44.81	3	14.94	53.44	<0.0001
Tratamientos*Hongo	4.32	6	0.72	2.58	0.0452
Error	6.71	24	0.28		
Total	153.27	35			

R²: 0.96 CV: 0.55

Cuadro 20. Prueba de Tukey (alfa=0.05), de remoción de los fungi en medio acuoso con zinc.

Tratamientos	Hongo	Medias (%)			
10 mg/L	<i>G. applanatum</i>	91.88	a		
10 mg/L	<i>P. sanguineus</i>	94.44		b	
10 mg/L	<i>S. commune</i>	95.43		b	c
10 mg/L	<i>P. ostreatus</i>	95.54		b	c
30 mg/L	<i>G. applanatum</i>	96.09		c	d
50 mg/L	<i>G. applanatum</i>	96.12		c	d
30 mg/L	<i>P. sanguineus</i>	97.44		d	e

30 mg/L	<i>S. commune</i>	97.49	d	e
30 mg/L	<i>P. ostreatus</i>	97.96		e f
50 mg/L	<i>P. sanguineus</i>	98.65		e f
50 mg/L	<i>S. commune</i>	98.92		e f
50 mg/L	<i>P. ostreatus</i>	99.05		f

Medias con una letra común no son significativamente diferentes

Para el análisis estadístico (Cuadro 20) referido al comportamiento de los cuatro fungi se plantearon las hipótesis correspondientes:

H₀: $\mu F1 = \mu F2 = \mu F3 = \mu F4$ y **H_a:** existe una μ o media diferente

En el ANVA, para la eficiencia de remoción en las interacciones tratamientos*hongos se aprecia que $p \text{ valor} = 0.0452 < \alpha = 0.05$, entonces se rechaza H₀, lo que implica que existe diferencia estadística significativa entre las interacciones hongo/tratamientos en referencia a la eficiencia de remoción del zinc.

Cuadro 21. Prueba de Tukey (alfa = 0.05), remoción de los fungi en medio acuoso con zinc, con respecto al tipo de fungi de pudrición blanca.

Hongo	Medias (%)	
<i>G. applanatum</i>	94.7	a
<i>P. sanguineus</i>	96.84	b
<i>S. commune</i>	97.28	b
<i>P. ostreatus</i>	97.52	b

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

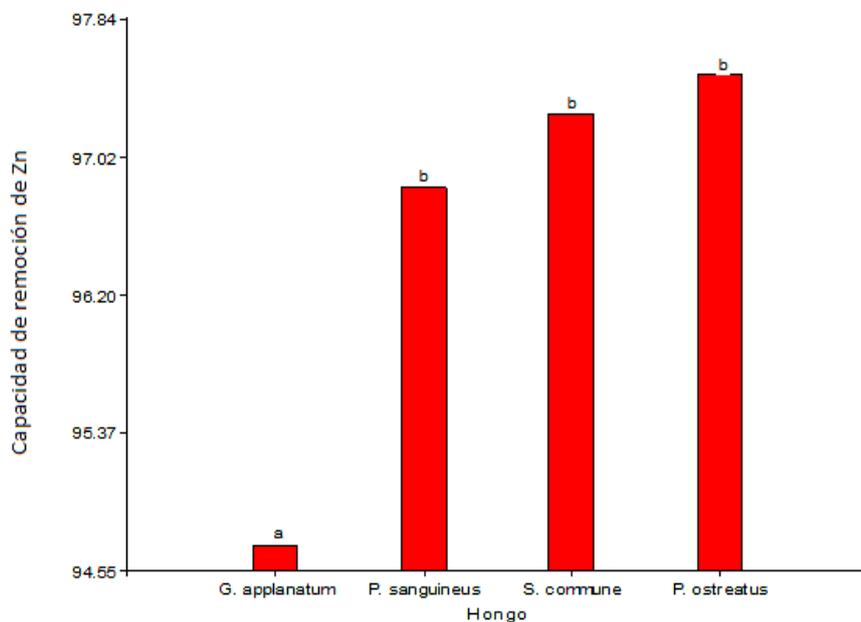


Figura 23. Eficiencia de remoción en medio acuoso con zinc, con respecto a los fungi de pudrición blanca

Cuadro 22. Prueba de Tukey (alfa = 0.05), remoción de los fungi en medio acuoso con zinc, con respecto a las concentraciones de zinc.

Tratamientos	Medias (%)	
10 mg/L	94.32	a
30 mg/L	97.25	b
50 mg/L	98.19	c

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

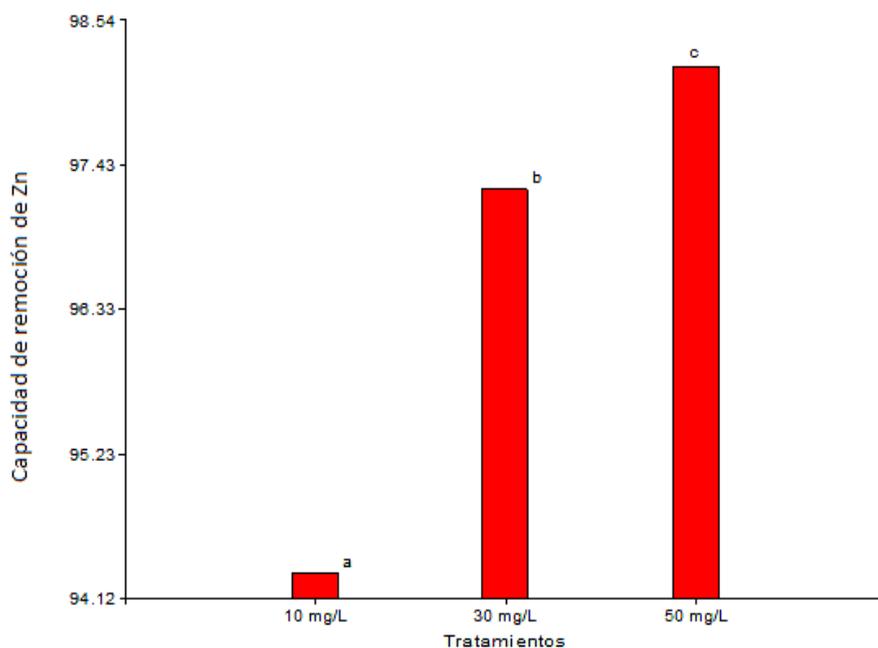


Figura 24. Eficiencia de remoción de los fungi en medio acuoso con zinc, con respecto a las concentraciones de zinc

La eficiencia de remoción de los fungi en medio acuoso con el elemento zinc (Cuadros 19 y 20), muestra que existe diferencia estadística significativa entre tratamientos, entre los fungi y entre las interacciones tratamientos/hongos. Asimismo, es necesario resaltar que tres de los cuatro fungi muestran altas eficiencias de remoción, con promedios que van entre 97.96 a 99.05 por ciento de remoción. El orden de importancia de acuerdo a los promedios de remoción de zinc, con respecto al tipo de fungi, se indica a *P. ostreatus*, *S. commune* y *P. sanguineus* (Cuadro 21, Figura 23). Asimismo, referente a las concentraciones de cobre usadas, la concentración de 50 mg/L ha sido el que ha obtenido mayor promedio de remoción (98.19) con respecto a los demás, tal como se aprecia en el Cuadro 22 y Figura 24.

V. DISCUSIÓN

5.1. Aislamiento y determinación de características morfológicas de cuatro fungi de pudrición blanca colectados en Tingo María

Con una y otra característica distintiva referido al tipo de crecimiento, textura, color o la presencia o no de micelio aéreo, el crecimiento de los cuatro fungi aislados en los medios de cultivo agar papa dextrosa y agar extracto de malta, muestran un crecimiento apropiado. Para los cuatro fungi, el tiempo requerido para cubrir las placas Petri de 90 mm de diámetro fue entre 8 a 15 días, siendo *G. applanatum* (Figura 13) el que tardó más tiempo (15 días), y los tres restantes *P. ostreatus*, *S. commune* y *P. sanguineus* (Figura 14 al 16) cubrieron el total del área de la placa entre 8 a 12 días, dependiendo del medio de cultivo, así como *P. ostreatus* crece más rápido en agar extracto de malta que en medio agar papa dextrosa, al respecto GUZMÁN (2000) indica que, el medio de cultivo a utilizar dependerá de la especie de hongo que se quiere cultivar, ya que cada especie tiene sus propios requerimientos nutricionales, definidos como un conjunto de elementos o sustancias que garantizan a un microorganismo, célula, o a un grupo de ellos, los nutrientes necesarios para su conservación, crecimiento y desarrollo; de igual modo, KING Y ENDERSON (1980), reporta que los fungi consumen compuestos orgánicos e inorgánicos. Los elementos inorgánicos incluidos en el sustrato artificial son: fósforo,

potasio, nitrógeno, sulfuro y magnesio, y en menor proporción: fierro, cobre, zinc y boro. El extracto de malta – agar es el más recomendado para las investigaciones científicas de pudrición de la madera, debido a que es rico en azúcares. Además, coincide con lo reportado por ROSALES (2008), donde obtiene cepas de *Pleurotus ostreatus* en agar con extracto de malta a 29-30°C y a obscuridad, donde observa colonias densas con micelio aéreo, textura algodonosa, con anillos concéntricos, la velocidad de crecimiento fue de 8.5 mm/día, requiriendo 11 días para cubrir la caja de Petri, el micelio fue blanquecino con tonos amarillentos. Asimismo, RODRÍGUEZ (1996) al estudiar el comportamiento de 5 cepas de *Pleurotos ostreatus* sobre 4 medios de cultivo sólido de laboratorio: agar con extracto de malta, agar con dextrosa y papa, agar con dextrosa sabouraud y agar con extracto de trigo, paja y malta; bajo condiciones de obscuridad total y a temperaturas de 28-30 °C, el medio de cultivo que resultó el más adecuado fue el de agar con extracto de trigo, paja y malta, donde el micelio se expandió a una velocidad de 2.5-5.0 mm/día, y se caracterizó por ser un micelio denso, arraigado, sumamente ramificado, vigoroso y con numerosas fíbulas. De igual modo HERNÁNDEZ y LÓPEZ (2009) al utilizar 5 cepas de *Pleurotos* nativas de la región del Sonocusco Chiapas, evaluó el crecimiento micelial en tres medios de cultivo: extracto de malta (EMA), papa dextrosa agar (PDA) y Sabouraud (SA), donde los resultados obtenidos mostraron que la mayor velocidad de crecimiento fue sobre EMA, con valores entre 18.14 mm/día.

En referencia a la temperatura sometidos a los cultivos de los cuatro fungi, fue de a temperatura ambiente y a oscuridad, característica en

cuanto a requerimiento de temperatura de la mayoría de fungi, el cual concuerda con lo reportado por EATON y HALE (1993), quienes señalan que la mayoría de los fungi son organismos mesófilos, es decir, crecen en un rango de temperatura de 10 y 40° C, con una temperatura óptima de entre 20 y 30° C. De manera natural, los fungi están supeditados a ciertas condiciones ambientales tales como la humedad relativa, temperatura, precipitación, inversiones térmicas, contaminación, disponibilidad de sustrato y actividades humanas, las que influyen de manera determinante en la proliferación y propagación de las partículas fúngicas hacia los espacios interiores (GUERRERO *et al.*, 2003). Viven en cualquier sitio que presente materia orgánica, humedad, y temperatura comprendida entre 4 y 60°C, en climas ecuatoriales, tropicales, subtropicales, templados y aún en los fríos, siempre que la temperatura no sea menor a 0° C, desde el nivel del mar hasta altitudes de más de 4000 metros (HERRERA y ULLOA, 1990).

5.2. Densidad celular fúngica en medio acuoso con cobre y zinc a bajas concentraciones

En nuestro estudio se seleccionaron a los fungi de pudrición blanca *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus sanguineus*, *Schizophyllum commune* y *Ganoderma applanatum*, para las pruebas de desarrollo de micelio en las distintas concentraciones de cobre y zinc en medio mínimo de sales minerales, los resultados obtenidos en promedio logran retener 2% del volumen del medio acuoso, lo que significa que ha existido buen crecimiento de micelio de los hongos, y esto refleja, en la eficiencia de remoción del cobre y zinc. El

desarrollo de biomasa fúngica sobre el cobre y zinc demuestra que los fungi producen enzimas que catalizaron la estructura de estos compuestos, posiblemente por la acción conjunta de Lignino-peroxidasa (LiP) y Manganoso-peroxidasa (MnP) y por la actividad de bencenodiol-oxígeno reductasa o Lacasa de acuerdo a lo afirmado por (CHÁVEZ-LÓPEZ *et. al.*, 2005) al demostrar que la Lacasa estaba comprometida en la degradación de fenantreno un hidrocarburo aromático policíclico (HAP) en solamente tres días de actividad. Estos hongos son efectivos porque producen una enzima extra celular llamada Lacasa, esta cataliza una reacción que degrada lignina, un compuesto aromático. Para catalizar estas reacciones poderosas la enzima requiere peróxido de hidrógeno, la cual el hongo produce. Asimismo MARIN *et al.* (2015), indica que varias levaduras, hongos, algas, bacterias y cierta flora acuática tienen la capacidad de concentrar metales a partir de soluciones acuosas diluidas y de acumularlas dentro de la estructura vegetal o microbiana. Por lo que un enfoque biológico cuenta con un gran potencial, ya que contribuye al objetivo de biorremediar y puede ser un proceso económico.

5.3. Eficiencia de remoción fúngica en medio acuoso con cobre y zinc a bajas concentraciones

Con respecto a la eficiencia de remoción fúngica de cobre generado por los cuatro fungi de pudrición blanca, todos muestran promedios significativos de remoción que van de 95.04 a 96.77 % de remoción, en orden de importancia se indican a *P. sanguineus*, *S. commune*, *P. ostreatus* y *G. applanatum*. De igual modo, con respecto a la eficiencia de remoción fúngica de

zinc generado por los cuatro fungi de pudrición blanca, muestra que tres de los cuatro fungi son más eficientes, con promedios que van de 97.96 a 99.05 % de remoción, en orden de importancia se indica a *P. ostreatus*, *S. commune* y *P. sanguineus*. Asimismo, en ambos casos tanto para cobre y zinc se da mayor promedio de remoción a concentraciones de 50 mg/L (95.14 y 98.19) respectivamente. Resultados similares a los obtenidos, indican MARIN *et al.* (2015), quienes al investigar cepas de *Pleurotus spp* en soluciones de cobre, lograron que la biomasa micelial retenga un promedio de 90% de cobre en condiciones de laboratorio. Por lo que, posiblemente la pared celular ha realizado la retención del metal mediante una interacción fisicoquímica (MORALES y RUIZ, 2008). Esto además, probablemente se ha generado por acción de la biosorción, que es un fenómeno físico-químico que se sustenta en la capacidad de los denominados materiales biológicos (biomasa) vivos o muertos, para acumular metales pesados principalmente de aguas residuales, involucrando al metabolismo microbiano, resaltando los procesos fisicoquímicos de adsorción desorción o absorción de dichos elementos metálicos (MARÍN *et al.*, 2015). Estos organismos y microorganismos involucrados son las algas, bacterias, hongos y levaduras, que han demostrado ser potenciales biosorbentes de metales (GADD, 1993; VOLESKY, 1995). Los hongos son efectivos en la degradación de una diversidad de contaminantes ambientales peligrosos y han sido bastante estudiados en la degradación de compuestos xenobióticos. Su capacidad para degradación a un compuesto tan complejo como la lignina, ha hecho considerar como una posible alternativa para la eliminación de otros muchos compuestos de baja biodegradabilidad

(DÁVILA y VÁSQUEZ, 2001). Siendo además, capaces de degradar la lignina por medio de la secreción de enzimas extracelulares mediante su metabolismo secundario, estas enzimas principalmente son la fenoloxidasa (lacasa) y dos peroxidasas, Manganese peroxidasa (MnP) y Lignina peroxidasa (LiP), esenciales para la degradación de la lignina (MÉNDEZ, 2013). Dentro de estos organismos, los hongos causantes de pudrición blanca muestran un gran potencial para su utilización en biorremediación (CARBAJAL, 2014).

VI. CONCLUSIONES

1. Se aislaron y determinaron las características morfológicas de los fungi de pudrición blanca *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma applanatum*, *Pycnoporus sanguineus* y *Schizophyllum commune*, usando dos medios nutritivos sólidos.
2. Los cuatro fungi de pudrición blanca usados en las pruebas a concentraciones de cobre y zinc lograron desarrollar micelio en más de 2% del volumen del medio acuoso, lo que se ve reflejado en la eficiencia de remoción de estos metales.
3. Mayor capacidad de remoción de cobre y en orden de importancia se logró con *P. sanguineus*, *S. commune*, *P. ostreatus* y *G. applanatum*, y en concentración de 50 mg/L se ha obtenido el mayor promedio de remoción (95.14%). Asimismo, Mayor eficiencia de remoción de zinc y en orden de importancia se consiguió con *P. ostreatus*, *S. commune* y *P. sanguineus*, e igualmente a concentración de 50 mg/L se ha obtenido el mayor promedio de remoción (98.19%).
4. Se acepta la hipótesis planteada, debido a que la capacidad de remoción de cobre y zinc fueron mayores a 60%.

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar investigaciones usando fungi ligninolíticos aislados de la zona, por ser un recurso del bosque y estar al alcance para su uso en la biorremediación y en otras formas.
- Plantear nuevas investigaciones con mayores concentraciones del elemento zinc y mediante pruebas en biorreactores considerando otras variables de medición, tales como pH, Temperatura, oxígeno disuelto, etc.
- Seguir apropiadamente con el protocolo de desinfección de basidiocarpos de las especies fúngicas para prevenir contaminación en la obtención de micelios.
- Inocular el sustrato líquido inmediatamente después del proceso de esterilización para evitar la contaminación con agentes extraños.

ABSTRACT

In the Amazon for its high biodiversity, there are many species of white rot fungi that require further investigation for use in future in biotechnology applications. The purpose of this research was to isolate white rot fungi four and determine mycelial biomass and removal efficiency of copper and zinc in aqueous medium with minimal mineral salts medium. To this end were isolated on potato dextrose agar and malt extract agar with the fungi *Ganoderma applanatum*, *Pycnoporus sanguineus*, *Schizophyllum commune* and *Pleurotus ostreatus* collected the Reserved Forest and Botanical Garden of the National Agrarian University of the Jungle, Tingo María. For testing concentrations of 10, 30 and 50 mg/L of copper and zinc were considered; being achieved mycelial biomass growth in 2% by volume of the aqueous medium. It has obtained a removal efficiency of copper (95.04 to 96.77 %) and in order of importance with *P. sanguineus*, *S. commune*, *P. ostreatus* and *G. applanatum*, and zinc removal efficiency (97.96 to 99.05 %) and in order of importance with *P. ostreatus*, *S. commune* and *P. sanguineus*. In both cases the concentration of 50 mg/L was obtained the highest average removal (95.14%).

Key words: characterization, colonies, white rot fungi, isolation.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AQUEVEQUE, P.; BECERRA, J.; PALFNER, G.; SILVA, M.; ALARCÓN, J.; ANKE, T.; STERNER, O. (2006). Antimicrobial Activity of Metabolites from Mycelial Cultures of Chilean Basidiomycetes, *J. Chil. Chi. Soc.* 51 (4): 1057-1060, Chile.
- AGRIOS, G. (2005). *Plant Pathology*, 5ta ed., . *Elsevier Academic Press, EE.*
- AIRA, M., PIONTELLI, L., JATO, R., y TORO, M. (2003). Concentración atmosférica invernal de propágulos fúngicos en un mercado interior de abastos en Valparaíso. *Boletín Micológico*, 29 - 37.
- ANDRADE, R., MATA, J., SÁNCHEZ, E. (2012). La producción Iberoamericana de hongos comestibles en el contexto internacional, *Hongos comestibles y medicinales en Iberoamérica. . Investigación y desarrollo en un entorno multicultural*, 9 - 16.
- BALDRIAN, P. (2002). Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 78 - 91.
- BOA, E. (2005). Los hongos silvestres comestibles, *Perspectiva global de su uso e importancia para la población. Productos Forestales no*

maderables Nº 17 de Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma.

CARBAJAL. (2014). Degradación de compuestos fenólicos por el hongo causante de pudrición blanca *Trametes versicolor*.

CASTRO, M., TAMARIZ, F., CASTELÁN, R., LINARES, G., y ALONSO, C. (2015). Adsorción de Cu y Cd por la biomasa micelar de tres cepas *Pleurotus*, hongo de la pudrición blanca. *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias*, 20 - 334.

CASTRO, C. (1998). Estudios de remoción de Cadmio y Plomo de aguas residuales industriales por adsorción empleando arcillas. Ingeniero Químico. Tesis Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá

CHAPARRO, D.; ROSAS, C. (2006). Aislamiento y Evaluación de la Actividad Enzimática de Hongos descomponedores de la madera en la Reserva Natural de Montaña de Ocaso. *Revista Iberoamericana de Mycología*.

CHÁVEZ-LÓPEZ, C.; ESPARZA- GARCÍA, J.; HIDALGO-LARA, M.; LOERACORRAL, O.; Y RODRIGUEZ-VÁSQUEZ, R. (2005). Producción de la Enzima Lacasa por el Hongo *Cladosporium cladosporioides* en presencia de frenanteno. Séptimo Congreso de la Sociedad Cubana de Bioingeniería.

COELLO, J. (2011). Aplicación del hongo *Pleurotus ostreatus* como alternativa para la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados. . Guayaquil.

- CÓRDOVA, H. (2010). Desinfección y cultivo de *Auricularia auricula* (L.:Fr.) Under y *Auricularia delicata* (Fr.) Henn a partir de Basidiocarpo y Basidiosporas. Tingo María.
- CRAFWORD, R. (1981). "Lignin biodegradation and transformation " John Wiley & Son, New York.
- DÁVILA, G. y VÁSQUEZ, R. (2001). Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. Instituto de Biotecnología.
- DEACON, J. (2002). *Modern Mycology*. Edinburgh: Black Well Science.
- EATON, R., & HALE, M. (1993). Wood, decay, pests and prevention. . Chapman and Hall, London.
- ESPINOZA, M., MATA, M., PAVLICH, M., y MORY, T. (2006). [En línea]: (<http://fm2.fieldmuseum.org/plantguides/guideimages.asp?ID=299>). Documento. Obtenido de Fieldmuseum
- FERNÁNDEZ, F. (2004). Guía práctica de producción de setas (*Pleurotus spp.*). Guadalajara.
- GADD, G. (1986). The uptake of heavy metals by fungi and yeasts: the chemistry and physiology of the process and applications for biotechnology. Immobilisation of Ions by Bio-sorption, 135 - 147.
- GADD, G. (1993.). Interaction of fungi with toxic metals. *New Phytol.*, 25 - 60.
- GASTÓN, G. (2003). Los Hongos del Edén. Introducción a la Micobiota Tropical de México. *Instituto de Ecología*, 203 - 204.

- GAYOSO, M. Obtenido de [En línea]: DIGITAL, (http://digeset.ucol.mx/tesis_posgrado/Pdf/Martha%20Gayosso%20Canales.pdf): DIGITAL
- GOLD, M. y ALLIC, M. (2001). Molecular Biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microb. Rew*, 605 - 622.
- GONZÁLES. (1996). Pudrición de la madera de diez especies forestales por acción de cinco hongos xilófagos. Lima.
- GUERRERO, T., RUIZ, S., y MARTÍNEZ, C. (2003). Aislamiento de hongos en instalaciones deportivas de la UNAM. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 93 - 96.
- GUPTA, R.; AHUJA, P.; KHAN, S.; SAXENA, K.; MOHAPATRA, H. (2000) Microbial biosorbents: Meeting challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. *Current science*, Vol. 78, p 8- 25
- GUZMÁN 2000. Genus *Pleurotus* (Jacq: Fr.) P. Kumm (Agaricomycetideae): diversity, taxonomic problems and desarrollo. Ciudad de Mexico.
- HALL, I. (2003). Edible and Poisonous Mushrooms Of the World. E.U.A. . *Timber Press*, 214 - 311.
- HAWKSWORTH. (2002). Why study Tropical Fungi. *Tropical Mycology*, 1 - 11.
- HERNÁNDEZ, R., Y LÓPEZ, C. (2009). Genus *Pleurotus* (Jacq: Fr.) P. Kumm (Agaricomycetideae): diversity, taxonomic problems and desarrollo.

- HERRERA, T. y ULLOA, M. (1990). El reino de los hongos. Micología básica y aplicada. Mexico.
- HIDALGO, S.; MARTÍNEZ, M. (2004). Reutilización de residuos de raspo de uva para la eliminación de metales tóxicos en los efluentes líquidos. Ingeniero Químico. Universidad Politécnica de Cataluña. Departamento de Ingeniería Química.
- HOLDRIDGE, L. (1987). Ecología basada en zonas de vida. IICA. San José, Costa Rica. San José.
- IQBAL, M.; EDIBEAN, R. (2004). Biosorption of lead, copper and Zinc ions on loofa sponge immobilized biomass of *Phanerochaete chrysosporium*. Mineral Engineer 17 : 217-223
- KAPOOR, A. y VIRARAGHAVAN, T. (1995). Fungal biosorption – An alternative treatment option for heavy metal bearing wastewater. *A review Bioresource Technol*, 195 - 206.
- KING, B. y ENDERSON, W. (1980). A bacterial contribution to wood nitrogen. *Int. Biodet.*, 79 - 84.
- KURNIAWAN, T. (2003). A research study on Cr (VI) removal from contaminated wastewater using low-cost adsorbents and commercial activated carbon. *Proceedings of the 2nd International Conference on Energy Technology towards a Clean Environment*, (págs. 1110 - 1117). Phuket.

- LÓPEZ, C. (1998). Transformación de tetracloroetano (TcCA) mediada por biopelículas de *Pseudomonas aeruginosa*. Trujillo.
- LOUKIDOU, M.; ZOUBOULIS, A.; KARAPANTSIOS, T.; MATIS, K. (2004). Equilibrium and kinetic modeling of chromium(VI) biosorption by *Aeromonas caviae*. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 242: 93–104.
- MALAGRE, A.; ARANTE, V.; MEDEIRO, C.; MACHUCA, A. (2002). Production of metal chelating compounds by white rot fungi, and their comparative abilities for pulp bleaching. *Enzyme and Microbial Technology*. 30 : 562 - 565
- MARCOVECCHIO, J. y MORENO, V. (1991). Metal accumulation in tissues of sharks from the Bahía Blanca Estuary, Argentina. *Marine Environmental Research*, 263-274. Obtenido de Cricyt.
- MARÍN, C., TAMARÍZ, F., CASTELAN, V., LINARES, F. y ALONSO, C. (2015). Adsorción de Cu y Cd por la biomasa micelial de tres cepas de *Pleurotus*, hongo de la pudrición blanca. . *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias*.
- MARRUGO, J. y PATERNINA, R. (2011). Evaluación de la contaminación por metales pesados en la ciénaga la Soledad y bahía de Cispatá, cuenca del bajo sinú, departamento de Córdoba. Córdoba.

- MARTÍNEZ, J. (2012). Cultivo de *Pleurotus ostreatus* en el valle de El fuerte, Sinaloa: una alternativa de aprovechamiento de esquilmos agrícolas. Valle El Fuerte.
- MÉNDEZ. (2013). Evaluación preliminar de la remoción de color en aguas de descarga producto del Proceso de curtido de pieles usando el hongo *Phanerochaete chrysosporium* en curtiembres Camelo. Manizales.
- MINAM. (2015). Modifican estándares nacionales de calidad ambiental para agua y establecen disposiciones complementarias para su aplicación. *El Peruano D. S. N° 015-2015*.
- MORALES, D., RUIZ, J. 2008. Determinación de la capacidad de remoción de cadmio, plomo y níquel por fungi de la podredumbre blanca inmovilizados. [En línea]: JAVERIANA (<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis148.pdf>, documento, Ene.2015)
- MUÑOZ, C. y GUILLEN, A. M. (1997). *Appl Environ Microbiol*.
- NAVARRO, A.; RAMOS, K.; CAMPOS, K.; MALDONADO, H. (2006) Elucidación del efecto del pH en la adsorción de metales pesados mediante biopolímeros naturales: cationes divalentes y superficies activas. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. Volumen 7(2) 113 -126
- NOVA. (2006). Manual de buenas prácticas de manufactura para la preservación de madera aserrada; acorde a los estándares expresados en las propuestas de normas. Dirección Nacional de Desarrollo de Comercio Exterior. Lima.

- O'BRIEN et al., 2002. Effects of hexavalent chromium on the survival and cell cycle distribution of DNA repair-deficient *S. cerevisiae*. *DNA Repair* 1: 617–627.
- ORTÍZ, I., SANZ, J., DORADO, M. y VILLAR, S. (2007). Metales pesados. La contaminación de los suelos. Técnicas de recuperación de suelos contaminados. Alalá: Universidad de Alcalá.
- PÉREZ-MORENO. (2012). Los hongos comestibles ectomicorrizicos y su biotecnología, Hongos comestibles y medicinales en Iberoamérica. Investigación y desarrollo en un entorno multicultural, 19-28.
- POINTING, S. B. (2001). Feasibility of bioremediation by white rot fungi. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 57:20-33.
- PRANCE, G. (1984). The use of edible fungi by Amazonian Indians. *Advances in Economic Botany*, 127-139.
- PRASAD, A. (2009). Impact of the discovery of human zinc deficiency on health. *J Am Coll Nutr*, 257 - 265.
- QUAN, M. (2009). Determinación de las características de cultivo in vitro, producción de inóculo y cuerpos fructíferos de una cepa Guatemalteca de *Schizophyllum commune* Fr. Guatemala.
- QINGBIAO, L.; SONGTAO, W.; GANG, L.; XINKAI, L.; XU, D.; DAOHUA, S.; YUELIN, H.; YILI, H. (2004). Simultaneous biosorption of cadmium (II)

and lead (II) ions by pretreated biomass of *Phanerochaete chrysosporium*. Separation and Purification Technology 34 135–142

REYES, S.; ALVARES, J. (2007). Fungal bioleaching of metals in preservative treated wood. Process biochemistry. 42 : 798-804

ROBLEDO, G. (2006). Taxonomía, Ecología y Diversidad de Poliporos. Cuszo.

RODRÍGUEZ, R. (1996). Caracterización de cepas del hongo comestible *Pleurotus* spp en medios de cultivo y su evaluación en substratos lignocelulosicos forrajeros para la producción de carpoforos.

ROSALES, L. M. (2008). Biorremediación de suelos contaminados con aceite usado de automvil con el hongo de la pudricion blanca *Pleurotus ostreatus* (setas) en Durango.

RUIZ, R. (1990). Aislamiento y cultivo del hongo comestible *Pleurotus* afin *ostreatus* (Jacq. ex Fr) Kumm. Tingo María.

RYVARDEN, L. (2007). Fundamentos Taxonómicos en Identificación de Poliporaceos y Ascomicetos Tropicales y Neotropicales. Oslo.

RYVARDEN, L. (1995). Sistemática y ecología de Basidiomicetes lignícolas. Caracas.

SMÂNIA, A.; MARQUES, C.; SMÂNIA, E.; ZANETTI, C.; CAROBREZ, S.; TRAMONTE, R.; LOGUERCIO-LEITE, C. (2003) «Toxicity and Antiviral Activity of Cinnabarin Obtained from *Pycnoporus sanguineus* (Fr.) Murr.», Phytother. Res. 17: 1069-1072, EE. UU.

SOLOMS, W. (2013). Actualidades sobre la biología del zinc. *Annales Nestlé*, 8 - 17.

TELLO, I. (2010). Diversidad de los recursos genéticos mexicanos del hongo funcional *ganoderma*, conocido como reishi en los mercados internacionales, y su relevancia para el desarrollo regional. puebla.

VOLESKY, B. a. (1995). Biosorption of heavy metals. *Biotechnol Prog*, 235 - 250.

ANEXOS

Anexo 1. Ficha de colección de fungi

N. Científico			CÓDIGO:
			Det.:
Localidad:			
Pais:	Prov.:	Región:	
Fecha.:	Colector:		
Coordenadas:			
Sustrato: Hábitat:			
Hábitat:			
Habito:			
OBSERVACIONES:			

<u>BASIDIOCARPO:</u>	
Medidas: L x A x E mm	Consistencia:
Forma:	Indumento:
Color:	
Píleo:	
Himenio:	
Superficie del píleo:	
Textura:	Margen:
<u>LAMINAS:</u> espacio entre laminas mm	laminas completas/incompletas: indicar:
<u>POROS:</u>	
Forma:	Tamaño /mm/cm2
Capa de tubos:	Contexto:
<u>PIE:</u>	
Forma:	Tamaño
Color:	Diámetro pie:
OBSERVACIONES:	

Anexo 2. Datos generales

Cuadro 23. Promedio de crecimiento radial de micelio de los fungi en medio de

Días	<i>G. applanatum</i>		<i>P. sanguineus</i>		<i>S. commune</i>		<i>P. ostreatus</i>	
	PDA	AEM	PDA	AEM	PDA	AEM	PDA	AEM
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	5	2	0	0	0	0
3	3	2	9	6	5	7	0	4
4	7	7	13	15	10	12	2	10
5	11	10	20	24	17	18	6	16
6	14	12	25	28	22	25	10	30
7	17	15	32	33	28	34	11	41
8	21	19	40	40	34	38	13	45
9	24	23	45	45	37	42	19	
10	28	27			41	45	28	
11	33	31			45		36	
12	36	35					45	
13	39	38						
14	42	41						
15	45	45						

cultivo (mm)

Las placas Petri usadas tuvieron 90 mm de diámetro (radio de 45 mm) para todos los tratamientos.

Cuadro 24. Biomasa micelial de los fungi, obtenidos en medio acuoso con el elemento cobre

Hongo	Código	Peso del filtrado	Peso papel filtro	Densidad Celular Fúngica (g/75mL)	Densidad Celular Fúngica (g/L)	Prom.
<i>Ganoderma applanatum</i>	T0R1	1.09	0.9	0.19	2.53	2.58
	T0R2	1.1	0.9	0.2	2.67	
	T0R3	1.09	0.9	0.19	2.53	
	X1C1R1	1.01	0.9	0.11	1.47	2.22
	X1C1R2	1.13	0.9	0.23	3.07	
	X1C1R3	1.06	0.9	0.16	2.13	
	X1C2R1	1.02	0.9	0.12	1.6	1.87
	X1C2R2	1.01	0.9	0.11	1.47	
	X1C2R3	1.09	0.9	0.19	2.53	

	X1C3R1	1.06	0.9	0.16	2.13	
	X1C3R2	1.01	0.9	0.11	1.47	1.82
	X1C3R3	1.04	0.9	0.14	1.87	
	T0R1	1.2	0.9	0.3	4	
	T0R2	1.19	0.9	0.29	3.87	3.91
	T0R3	1.19	0.9	0.29	3.87	
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	X1C1R1	1.04	0.9	0.14	1.87	
	X1C1R2	1.03	0.9	0.13	1.73	2
	X1C1R3	1.08	0.9	0.18	2.4	
	X1C2R1	0.83	0.66	0.17	2.27	
	X1C2R2	0.98	0.9	0.08	1.07	1.29
	X1C2R3	0.94	0.9	0.04	0.53	
	X1C3R1	1.24	0.9	0.34	4.53	
	X1C3R2	1.12	0.9	0.22	2.93	3.33
	X1C3R3	1.09	0.9	0.19	2.53	
	T0R1	1.14	0.9	0.24	3.2	
	T0R2	1.09	0.9	0.19	2.53	2.84
	T0R3	1.11	0.9	0.21	2.8	
<i>Schizophyllum commune</i>	X1C1R1	0.99	0.9	0.09	1.2	
	X1C1R2	1.03	0.9	0.13	1.73	1.33
	X1C1R3	0.98	0.9	0.08	1.07	
	X1C2R1	0.96	0.9	0.06	0.8	
	X1C2R2	0.99	0.9	0.09	1.2	1.02
	X1C2R3	0.98	0.9	0.08	1.07	
	X1C3R1	0.97	0.9	0.07	0.93	
	X1C3R2	0.97	0.9	0.07	0.93	0.98
	X1C3R3	0.98	0.9	0.08	1.07	
	T0R1	1.21	0.9	0.31	4.13	
	T0R2	1.18	0.9	0.28	3.73	3.91
	T0R3	1.19	0.9	0.29	3.87	
<i>Pleurotus ostreatus</i>	X1C1R1	1.11	0.9	0.21	2.8	
	X1C1R2	1.07	0.9	0.17	2.27	2.31
	X1C1R3	1.04	0.9	0.14	1.87	
	X1C2R1	1.07	0.9	0.17	2.27	
	X1C2R2	1.07	0.9	0.17	2.27	2.09
	X1C2R3	1.03	0.9	0.13	1.73	
	X1C3R1	1.06	0.9	0.16	2.13	
	X1C3R2	1.24	0.9	0.34	4.53	3.24

X1C3R3 1.13 0.9 0.23 3.07

Cuadro 25. Biomasa micelial de los hongos, obtenidos en medio acuoso con el elemento zinc.

Hongo	Código	Peso del filtrado	Peso papel filtro	Densidad Celular Fúngica (g/75 mL)	Densidad Celular Fúngica (g/L)	Promedio
<i>Ganoderma applanatum</i>	ToR1	1.09	0.9	0.19	2.53	2.49
	ToR2	1.1	0.9	0.2	2.67	
	ToR3	1.07	0.9	0.17	2.27	
	X2C1R1	1.06	0.9	0.16	2.13	2.09
	X2C1R2	1.06	0.9	0.16	2.13	
	X2C1R3	1.05	0.9	0.15	2	
	X2C2R1	1.11	0.9	0.21	2.8	2.05
	X2C2R2	1.01	0.9	0.11	1.47	
	X2C2R3	1.04	0.9	0.14	1.87	
	X2C3R1	0.96	0.9	0.06	0.8	0.85
	X2C3R2	0.98	0.9	0.08	1.07	
	X2C3R3	0.95	0.9	0.05	0.67	
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	ToR1	1.08	0.9	0.18	2.4	2.44
	ToR2	1.09	0.9	0.19	2.53	
	ToR3	1.08	0.9	0.18	2.4	
	X2C1R1	1.09	0.9	0.19	2.53	2.75
	X2C1R2	1.11	0.9	0.21	2.8	
	X2C1R3	1.12	0.9	0.22	2.93	
	X2C2R1	1.1	0.9	0.2	2.67	2.4
	X2C2R2	1.08	0.9	0.18	2.4	
	X2C2R3	1.06	0.9	0.16	2.13	
	X2C3R1	1.03	0.9	0.13	1.73	1.82
X2C3R2	1.05	0.9	0.15	2		
X2C3R3	1.03	0.9	0.13	1.73		
<i>Schizophyllum commune</i>	ToR1	0.95	0.9	0.05	0.67	0.84
	ToR2	0.98	0.9	0.08	1.07	
	ToR3	0.96	0.9	0.06	0.8	

	X2C1R1	1.02	0.9	0.12	1.6	
	X2C1R2	1	0.9	0.1	1.33	1.64
	X2C1R3	1.05	0.9	0.15	2	
	X2C2R1	0.96	0.9	0.06	0.8	
	X2C2R2	0.95	0.9	0.05	0.67	0.85
	X2C2R3	0.98	0.9	0.08	1.07	
	X2C3R1	1.01	0.9	0.11	1.47	
	X2C3R2	1	0.9	0.1	1.33	1.29
	X2C3R3	0.98	0.9	0.08	1.07	
	ToR1	1.06	0.9	0.16	2.13	
	ToR2	1.03	0.9	0.13	1.73	1.91
	ToR3	1.04	0.9	0.14	1.87	
	X2C1R1	1.06	0.9	0.16	2.13	
	X2C1R2	1.07	0.9	0.17	2.27	2.09
	X2C1R3	1.04	0.9	0.14	1.87	
<i>Pleurotus ostreatus</i>	X2C2R1	1.17	0.9	0.27	3.6	
	X2C2R2	1	0.9	0.1	1.33	2.44
	X2C2R3	1.08	0.9	0.18	2.4	
	X2C3R1	1.17	0.9	0.27	3.6	
	X2C3R2	1.02	0.9	0.12	1.6	2.62
	X2C3R3	1.1	0.9	0.2	2.67	

Cuadro 26. Datos de eficiencia de remoción de cobre, por los fungi de pudrición blanca.

G. applanatum

Lectura de Cu en el espectrofotómetro

Repetición	Concentración (mg/L)		
	10	30	50
R1	0.82	1.5	2.05
R2	0.69	2.06	2.06

R3	0.86	1.88	2.18
PROM	0.79	1.82	2.09

Eficiencia de remoción

Repetición	Concentración (mg/L)		
	10	30	50
R1	91.8	93.95	95.81
R2	93.1	94.99	95.89
R3	91.4	93.73	95.64

P. sanguineus

Lectura de Cu en el espectrofotómetro

Repetición	Concentración (mg/L)		
	10	30	50
R1	0.61	1.56	1.51
R2	0.91	1.3	1.7
R3	0.84	1.51	1.63
PROM	0.79	1.46	1.62

Eficiencia de remoción

Repetición	Concentración (mg/L)		
------------	----------------------	--	--

	10	30	50
R1	93.88	94.8	96.97
R2	90.86	95.68	96.59
R3	91.6	94.97	96.74

S. commune

Lectura de Cu en el espectrofotómetro

Repetición	Concentración (mg/L)		
	10	30	50
R1	0.61	1.56	1.51
R2	0.91	1.3	1.7
R3	0.84	1.51	1.63
PROM	0.79	1.46	1.62

Eficiencia de remoción

Repetición	Concentración (mg/L)		
	10	30	50
R1	95.92	93.87	93.79
R2	94.41	94.41	94.23
R3	94.8	94.16	94.08

P. ostreatus

Lectura de Cu en el espectrofotómetro

Repetición	Concentración (mg/L)		
	10	30	50

R1	0.29	2.21	3.1
R2	0.36	2.08	2.87
R3	0.45	2.19	3.07
PROM	0.37	2.16	3.01

Eficiencia de remoción

Repetición	Concentración (mg/L)		
	10	30	50
R1	97.12	92.64	93.8
R2	96.37	93.07	94.268
R3	95.5	92.7	93.86

Cuadro 27. Datos de eficiencia de remoción de zinc por los fungi de pudrición

G. applanatum

Lectura de Zn en el espectrofotómetro

Repetición	Concentración (mg/L)		
	10	30	50
R1	0.8	1.52	1.76
R2	0.89	0.88	2.06
R3	0.74	1.12	1.99
PROM	0.81	1.17	1.94

Eficiencia de remoción

Repetición	Concentración (mg/L)		
	10	30	50
R1	91.97	94.94	96.47
R2	91.09	97.067	95.882
R3	92.59	96.263	96.016

P. sanguineus

Lectura de Zn en el espectrofotómetro

Repetición	Concentración (mg/L)		
	10	30	50
R1	0.47	0.83	0.4
R2	0.56	0.7	0.8
R3	0.64	0.78	0.82
PROM	0.56	0.77	0.67

Eficiencia de remoción

Repetición	Concentración (mg/L)		
	10	30	50
R1	95.33	97.246667	99.194
R2	94.38	97.676667	98.404
R3	93.6	97.39	98.36

S. commune

Lectura de Zn en el espectrofotómetro

Repetición	Concentración (mg/L)		
	10	30	50
R1	0.46	0.83	0.3
R2	0.44	0.65	0.7
R3	0.47	0.77	0.63
PROM	0.46	0.75	0.54

Eficiencia de remoción

Repetición	Concentración (mg/L)		
	10	30	50
R1	95.45	97.233	99.406
R2	95.56	97.823	98.604
R3	95.28	97.433	98.74

P. ostreatus

Lectura de Zn en el espectrofotómetro

repetición	Concentración (mg/L)		
	10	30	50
R1	0.47	0.54	0.36
R2	0.43	0.61	0.4
R3	0.44	0.68	0.66

PROM	0.45	0.65	0.53
------	------	------	------

Eficiencia de remoción

Repetición	Concentración (mg/L)		
	10	30	50
R1	95.26	98.187	99.284
R2	95.72	97.967	99.196
R3	95.64	97.733	98.68
