



Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión

Facultad de Ciencias

Escuela Profesional de Biología con Mención en Biotecnología

Eficiencia de suspensión biológica de *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus sanguineus* para remediar suelos contaminados con Hidrocarburo - 2023

Tesis

Para optar el Título Profesional de Biólogo con Mención en Biotecnología

Autores

John Andy Acuña Zanabria

Elvis Daniel Simbron Sosa

Asesor

Dr. William Andrés Guzmán Sánchez

Huacho – Perú

2024



Reconocimiento - No Comercial – Sin Derivadas - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Reconocimiento: Debe otorgar el crédito correspondiente, proporcionar un enlace a la licencia e indicar si se realizaron cambios. Puede hacerlo de cualquier manera razonable, pero no de ninguna manera que sugiera que el licenciante lo respalda a usted o su uso. **No Comercial:** No puede utilizar el material con fines comerciales. **Sin Derivadas:** Si remezcla, transforma o construye sobre el material, no puede distribuir el material modificado. **Sin restricciones adicionales:** No puede aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros de hacer cualquier cosa que permita la licencia.



UNIVERSIDAD NACIONAL JOSÉ FAUSTINO SÁNCHEZ CARRIÓN

LICENCIADA

(Resolución de Consejo Directivo N° 012-2020-SUNEDU/CD de fecha 27/01/2020)

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA CON MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

METADATOS

DATOS DEL AUTOR (ES):		
NOMBRES Y APELLIDOS	DNI	FECHA DE SUSTENTACIÓN
John Andy Acuña Zanabria	77468828	25/09/2024
Elvis Daniel Simbron Sosa	75739064	25/09/2024
DATOS DEL ASESOR:		
NOMBRES Y APELLIDOS	DNI	CÓDIGO ORCID
Dr. William Andrés, Guzmán Sánchez	06015776	0000-0003-1424-4287
DATOS DE LOS MIEMBROS DE JURADOS – PREGRADO/POSGRADO- MAESTRÍA-DOCTORADO:		
NOMBRES Y APELLIDOS	DNI	CODIGO ORCID
Huberto Williams Noriega Córdova	18172332	0000-0003-0882-092X
Carmen Lucy Cabrel Palomares	15693526	0000-0002-5142-8918
Miguel Angel Aguilar Luna Victoria	17854491	0000-0003-1699-1913

Eficiencia de suspensión biológica de *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus sanguineus* para remediar suelos contaminados c...

- Quick Submit
- Quick Submit
- Facultad de Ciencias

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid::1.2996119411

Fecha de entrega

2 sep 2024, 8:56 a.m. GMT-5

Fecha de descarga

2 sep 2024, 9:15 a.m. GMT-5

Nombre de archivo

MBRON_SOSA_ELVIS_2024_062204_ACU_A_ZANABRIA_JOHN_2024-062016.pdf

Tamaño de archivo

4.1 MB

76 Páginas

17,213 Palabras

106,058 Caracteres



Página 2 of 94 - Descripción general de integridad

Identificador de la entrega trn:oid::1.2996119411

18% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- Coincidencias menores (menos de 10 palabras)

Fuentes principales

17% Fuentes de Internet

4% Publicaciones

10% Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alertas de integridad para revisión

No se han detectado manipulaciones de texto sospechosas.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que puede revisarse.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y lo revise.

Dedicatoria

Este trabajo va dedicado primeramente a Dios por encaminarnos por el buen camino y también a nuestras familias por brindarnos y apoyarnos en todo, quienes nos dieron su confianza y su paciencia en la culminación de este trabajo y por habernos inculcado los valores para seguir avanzando día a día, y a nuestros docentes por enseñarnos e inspirarnos cada día gracias a ellos por darnos los conocimientos que hemos adquirido durante nuestra vida universitaria para seguir constante para nuestra ejecución de nuestras metas.

John y Elvis

Agradecimiento

Con especial gratitud, queremos expresar nuestro profundo agradecimiento al Dr. William Guzmán Sánchez por su invaluable apoyo y por impulsarnos a superarnos a pesar de las adversidades. Su orientación y sus consejos, basados en su vasta experiencia profesional, Finalmente queremos agradecer a la Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión (UNJFSC), y a la E.P de Biología con mención en Biotecnología por permitirnos desarrollarnos como buenos durante el tiempo la dedicación y el compromiso del cuerpo docente desde del inicio hasta el final de nuestra formación profesional han sido fundamentales para alcanzar nuestras metas y desarrollarnos y permitirnos a contribuir a la ciencia.

Índice

Dedicatoria	5
Agradecimiento	6
Índice	7
Índice de anexos	10
Índice de tablas	11
Índice de figuras.....	12
Abreviaturas	13
Resumen	14
Abstract	15
Introducción.....	16
Capítulo I. Planteamiento del problema	17
1.1 Descripción de la realidad problemática	17
1.2 Formulación del problema	18
1.2.1 Problema general.	18
1.2.2 Problema específico.	18
1.3 Objetivos de la Investigación	18
1.3.1 Objetivo general.....	18
1.3.2 Objetivo específico.	18
1.4 Justificación de la Investigación.....	18
1.5 Delimitación del estudio	19
1.6 Viabilidad del estudio	19
Capítulo II. Marco teórico	20
2.1 Antecedentes de la Investigación	20
2.1.1 Investigaciones internacionales.	20
2.1.2 Investigaciones nacionales.	22
2.2 Bases teóricas	23
2.2.1 Contaminantes de suelos.....	23
2.2.2 Hidrocarburos.....	23
2.2.3 Generalidades de Basidiomicetos.....	24
2.2.4 Mecanismo enzimático de los Basidiomicetos.	24
2.2.5 Hongo ostra o seta: <i>Pleurotus ostreatus</i>	24
2.2.6 Hongo Saprobioótico: <i>Pycnoporus sanguineus</i>	25
2.2.7 Importancia de los basidiomicetos.	26
2.2.8 Normativa de suelos contaminados.	26

2.2.9	Suspensión Biológica.....	27
2.2.10	Crudo de petróleo.....	27
2.2.11	Biorremediación.....	27
2.2.11.1	Biorremediación in situ.....	28
2.2.11.2	Biorremediación ex situ.....	28
2.2.12	Basidiomicetos como Biorremediadores.....	28
2.2.13	Regiones ITS1 – ITS4.....	29
2.3	Definiciones conceptuales de términos básicos.....	30
2.3.1	Temperatura.....	30
2.3.2	Potencial de hidrógeno (pH).....	30
2.3.3	Inóculo líquido.....	31
2.3.4	Inóculo semilla.....	31
2.3.5	Mineralización de los Hongos.....	31
2.3.6	Compuestos recalcitrantes.....	31
2.3.7	Humedad.....	32
2.3.8	Hidrocarburos totales de Petróleo (THP Fracción 1).....	32
2.3.9	Xenobióticos.....	32
2.3.10	Surfactante.....	33
2.3.11	Gravimetría.....	33
2.3.12	Estructura del suelo.....	33
2.4	Formulación de Hipótesis.....	33
2.4.1	Hipótesis general.....	33
2.4.2	Hipótesis específica.....	34
2.4.3	Operacionalización de variables e indicadores.....	34
Capítulo III. Metodología de la investigación.....		35
3.1	Diseño metodológico.....	35
3.1.1	Tipo de investigación.....	35
3.1.2	Nivel de investigación.....	35
3.1.3	Enfoque.....	35
3.2	Población y muestra.....	35
3.2.1	Población.....	35
3.2.2	Muestra.....	35
3.2.2.1	Procedimiento para la recolección de los especímenes.....	36
3.2.2.2	Reconocimiento de signos.....	36
3.3	Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	36
3.3.1	Técnicas a emplear.....	36
3.3.1.1	Preparación de medio de cultivo.....	36

3.3.1.2	Plaqueo.....	37
3.3.1.3	Desinfección y siembra.....	37
3.3.1.4	Preparación de inóculo primario de <i>P. ostreatus</i>	37
3.3.1.5	Preparación de inóculo secundario.....	38
3.3.1.6	Preparación de inóculo de <i>P. sanguineus</i>	38
3.3.1.7	Preparación de Peptona-Sacarosa.	38
3.3.1.8	Recuento de esporas/mL en cámara de Neubauer.	38
3.3.1.9	Extracción de ADN para <i>Pleurotus ostreatus</i>	38
3.3.1.10	Secuenciamiento del material genómico de <i>Pycnoporus sanguineus</i>	40
3.3.1.11	Preparación del inóculo.	41
3.3.1.12	Preparación de la muestra.	41
3.3.1.13	Suspensión de <i>Pleurotus. ostreatus</i> y <i>Pycnoporus. sanguineus</i>	42
3.3.2	Determinaciones fisicoquímicas del suelo.	42
3.3.2.1	Valor del pH del suelo contaminado con suspensión micelial.	42
3.3.2.2	Humedad.	42
3.3.3	Eficiencia de Remoción.	43
3.3.4	Técnicas para el procesamiento de la información.....	44
Capítulo IV. Resultados		44
4.1	Recolección de las muestras de <i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>Pycnoporus sanguineus</i>	44
4.2	Aislamiento de <i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>Pycnoporus sanguineus</i>	44
4.3	Extracción de ADN.....	46
4.4	Secuenciamiento de <i>Pycnoporus sanguineus</i>	47
4.5.	Análisis fisicoquímicos durante el proceso de Biodegradación.....	48
4.6	Estimación de biomasa del micelio de <i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>Pycnoporus sanguineus</i>	49
4.7	Degradación de hidrocarburos totales (HT).....	50
4.7.1	Biodegradación de HT.....	50
4.7.2	Cuantificación de Hidrocarburos Totales por Cromatografía de gases.....	50
4.8	Contraste de Hipótesis estadísticas	52
Capítulo V. Discusión		55
5.1	Discusión de resultados	55
Capítulo VI. Conclusiones y recomendaciones		59
6.1	Conclusiones	59
6.2	Recomendaciones.....	59
Referencias		60
Anexos.....		66

Índice de anexos

Anexo 1.	Flujograma de bloques de procedimientos realizados trabajo 01.....	66
Anexo 2.	Flujograma de bloques de procedimientos realizados trabajo 02.	67
Anexo 3.	Servicio de la Empresa BTS para el secuenciamiento DNA barcoding.....	68
Anexo 4.	Servicios prestados de la Empresa SLab, para los procesos de TPH.	68
Anexo 5.	Análisis de datos.	69
Anexo 6.	Resultados de reporte de secuenciamiento de los hongos.	70

Índice de tablas

Tabla 1.	Ventajas y Desventajas del tratamiento de Biorremediación in situ y ex situ.....	28
Tabla 2.	Operacionalización de Variables e Indicadores.	34
Tabla 3.	Variables experimentales.	34
Tabla 4.	Formulación del gel de agarosa al 1%	39
Tabla 5.	Primers utilizados para las amplificaciones de ADN.....	40
Tabla 6.	Halos de crecimiento micelial de <i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>Pycnoporus sanguineus</i> , periodo de incubación de 20 días a 27°C bajo condiciones de oscuridad.	45
Tabla 7.	Las diez primeras especies putativas de acuerdo con su comparación BLAST con la base de datos del GenBank. 47	
Tabla 8.	Caracterización de parámetros evaluados por <i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>Pycnoporus sanguineus</i>	51
Tabla 9.	Tratamientos empleados para la prueba de normalidad de los niveles de hidrocarburo (mg/Kg).	52
Tabla 10.	Prueba de homogeneidad de varianza de los tratamientos empleados para los niveles de hidrocarburo(mg/Kg).....	53
Tabla 11.	Resumen del ANOVA de los tratamientos empleados para los niveles de hidrocarburo (mg/Kg).	53
Tabla 12.	Comparaciones múltiples de Tukey de los tratamientos empleados para los niveles de hidrocarburo (mg/Kg). 53	
Tabla 13.	Días de incubación y biomasa de tratamientos.	69
Tabla 14.	Tratamientos empleados y niveles de hidrocarburos totales.....	69
Tabla 15.	Características de los hongos objetivos del estudio.	77

Índice de figuras

Figura 1.	Anatomía de un hongo Basidiomiceto. Fuente: Herrera & Ulloa, 1990.	24
Figura 2.	<i>Pycnoporus sanguineus</i> . Fuente: Rodríguez, 2018.	26
Figura 3.	Agrupamiento de genes ARNe y posiciones de los primers de PCR de hongos (Higgins, 2012).	29
Figura 4.	Localización de las zonas de muestreo (puntos amarillos) de suelo contaminado y recolección de los basidiomicetos. Fuente: Google Maps.	44
Figura 5.	Crecimiento micelial, en medio de cultivo PDA cepas a 27°C lado izquierdo (A). Cepa de <i>Pleurotus ostreatus</i> (día 05), lado derecho (B) cepa <i>Pycnoporus sanguineus</i> (día 05).	45
Figura 6.	Extracción de ADNg en Gel de agarosa al 0,7% cepas híbridas para la identificación de <i>Pleurotus ostreatus</i>	46
Figura 7.	Resultados de Periodo de pH en días en <i>P. ostreatus</i> y <i>P. sanguineus</i>	48
Figura 8.	Resultados del Periodo de Humedad en días %.	49
Figura 9.	Resultados de Periodo de temperatura en días.	49
Figura 10.	Crecimiento del micelio en suelos contaminados con hidrocarburo.	49
Figura 11.	Resultado de Biodegradación hidrocarburo en suelo contaminado.	50
Figura 12.	Porcentaje por cromatografía de gases THP Final.	51
Figura 13.	Recolección del material biológico (lado izquierdo), selección y desinfección de muestra de <i>Pycnoporus sanguineus</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> en el laboratorio (lado derecho).	71
Figura 14.	<i>Pycnoporus sanguineus</i> muestras en madera descompuesta para estudio en laboratorio.	71
Figura 15.	Muestras recolectadas de estudio <i>Pleurotus ostreatus</i> (derecho), <i>Pycnoporus sanguineus</i> (izquierda).	72
Figura 16.	Desinfección de material biológico y siembra.	72
Figura 17.	Bolsas de tierra contaminada con hidrocarburo procedente de San Juan Bautista, Loreto.	73
Figura 18.	Preparación de medios para siembra de estudio.	73
Figura 19.	Obtención de Cepas puras; <i>Pycnoporus sanguineus</i> (día 18) lado izquierdo, cepa de <i>Pleurotus ostreatus</i> (día 15) lado derecho.	73
Figura 20.	Homogenización para inoculación y suspensión micelial de los basidiomicetos.	74
Figura 21.	Macetas con muestra de suelo contaminado en suspensión de <i>Pleurotus ostreatus</i>	74
Figura 22.	Análisis de parámetro de pH al suelo y temperatura en el sitio de ensayo.	75
Figura 23.	Evaluación del porcentaje de la humedad y de materia orgánica.	75
Figura 24.	Proceso de muestra para cromatografía de gases Método Fracción 1 (C6-C10) EPA METHOD 8015.	76
Figura 25.	Destilación y colocación de la muestra del ensayo en viales para las lecturas en la cromatografía de gas.	76
Figura 26.	NanoDrop 2000 espectrofotómetro de luz UV visible de espectro completo.	76

Abreviaturas

TPH: Hidrocarburo totales de petróleo

ITS: *Internal Transcribed Spacer*

ANOVA: Análisis de varianza

ADN: *Deoxyribonucleic acid* o ácidodesoxirribonucleico

mg/ml: Miligramos por litro

°C: Grado Celsius

PDA: *Potato Dextrose Agar*

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

HAPs: Hidrocarburos aromáticos policíclicos

ADNr: Ribosomal DNA

MAS: Manera aleatoria simple

CO₂: Dióxido de carbono

UV: Radiación ultravioleta

pH: Potencial de hidrogeno

GenBank: Base de datos de secuencias genética

μL: Microlitro

MINAM: Ministerio del ambiente - Perú

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad Agraria del Perú

CaCo₃: Carbonato de Calcio

mL: Mililitro

Kb: Kilobase

Pb: Pares de base

CaSO₄ – 2H₂O: Sulfato de calcio deshidratado

LiP: Lignina Peroxidasa.

Spp: Varias especies del mismo género.

Resumen

El empleo de basidiomicetos en la biorremediación ha despertado un creciente interés en tiempos recientes debido a su capacidad para degradar compuestos recalcitrantes, así como a su bajo costo y facilidad de manipulación, en comparación con las bacterias. Esto resalta la necesidad de utilizar hongos para la biorremediación de suelos.

Objetivos: Determinar la eficiencia de suspensión biológica de los dos tratamientos *Pleurotus ostreatus* y *Pycnoporus sanguineus* para remediar suelos contaminados con hidrocarburos.

Metodología: En este estudio, la población estuvo conformada por los basidiomicetos *P. ostreatus* y *P. sanguineus*, así como por muestras de tierra contaminada con petróleo del distrito de San Juan Bautista, provincia de Maynas – Loreto. Se aislaron y purificaron las muestras en PDA a 27°C durante 5 días para el crecimiento en medio sólido, realizando la caracterización morfológica y fenotípica en placa. Para la identificación, se secuenció el hongo *P. sanguineus* y se contó el número de esporas/mL en la cámara de Neubauer en alícuotas de 100 µL de la biomasa de *P. ostreatus* y *P. sanguineus*, que fueron cultivadas en trigo y en sustrato de bagazo. La evaluación de la remediación del suelo contaminado se realizó en diversos tiempos, manteniendo condiciones adecuadas de humedad, pH y temperatura óptima, evaluando la eficiencia de remoción de TPH cada 5 días.

Resultados: Se observaron diferencias significativas en la remediación entre los distintos tratamientos, con niveles de colonización más elevados en algunos, resultando en suelos más limpios y tratables. Las curvas obtenidas mostraron una mayor degradación y eficiencia en los tratamientos más efectivos.

Conclusión: Este estudio demuestra que los basidiomicetos en suelos contaminados pueden generar cambios significativos en sus características y estructura. *P. ostreatus* y *P. sanguineus* se perfilan como opciones viables para la remediación de suelos debido a su capacidad para desarrollarse en condiciones desfavorables, alcanzando un 95% de fiabilidad en su uso para la industria.

Palabras clave: *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus sanguineus*, remediación, contaminación

Abstract

The use of basidiomycetes in bioremediation has garnered growing interest recently due to their ability to degrade recalcitrant compounds, as well as their low cost and ease of handling compared to bacteria. This highlights the need to utilize fungi for soil bioremediation.

Objectives: To determine the efficiency of biological suspension of two treatments, *Pleurotus ostreatus* and *Pycnoporus sanguineus*, in remediating soils contaminated with hydrocarbons.

Methodology: This study involved the basidiomycetes *P. ostreatus* and *P. sanguineus*, along with samples of petroleum-contaminated soil from the district of San Juan Bautista, province of Maynas – Loreto. The samples were isolated and purified on PDA at 27°C for 5 days to allow growth on a solid medium, followed by morphological and phenotypic characterization on a plate. For identification, *P. sanguineus* was sequenced, and the number of spores/mL was counted using a Neubauer chamber in 100 µL aliquots of the biomass of *P. ostreatus* and *P. sanguineus*, which were cultured on wheat and bagasse substrate. The contaminated soil remediation evaluation was conducted over various time periods, maintaining appropriate moisture, pH, and optimal temperature conditions, and assessing the TPH removal efficiency every 5 days.

Results: Significant differences were observed in the remediation between the different treatments, with higher levels of colonization in some treatments resulting in cleaner and more treatable soils. The resulting curves indicated greater degradation and efficiency in the most effective treatments.

Conclusion: This study demonstrates that basidiomycetes in contaminated soils can significantly alter soil characteristics and structure. *P. ostreatus* and *P. sanguineus* emerge as viable options for soil remediation due to their ability to thrive under unfavorable conditions, achieving a 95% reliability rate for industrial use.

Key words: *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus sanguineus*, remediation, contamination.

Introducción

El rápido desarrollo de la economía durante los últimos 40 años debido a la industrialización acelerada ha mejorado la productividad como también ha causado impactos negativos en el entorno ecológico, especialmente con respecto a la contaminación del suelo cada vez más crítica (Li, et al., 2019) informó sobre suelos de Wonocolo en Indonesia contaminados con hidrocarburos totales de petróleo mostró que existen considerables riesgos para la salud que son potencialmente tóxicos para los humanos en el área local y recomendó una remediación usando métodos biológicos para reducir el nivel de contaminación de TPH.

De otro lado, la tecnología de la biorremediación se considera eficiente, es de bajo costo, no requiere ninguna habilidad técnica para funcionar y, en su mayoría, no tiene un impacto negativo en el ecosistema. Aunque la eficacia del tratamiento de biorremediación se ve inhibida por las propiedades de los contaminantes, la matriz del suelo y los factores ecológicos, sigue siendo el proceso elegido por la mayoría de los ambientalistas (Okoh, et al., 2019). La biorremediación es un enfoque biotecnológico rentable y prometedor, cada vez más estudiado e implementado, que ofrece la posibilidad de destruir o volver inofensivos varios contaminantes, incluidos los hidrocarburos de petróleo e incluso algunos contaminantes de preocupación emergente por la actividad biológica natural. Tiene una ventaja sobre otros métodos para la desintoxicación o degradación de contaminantes ambientales (Okoh, et al., 2019).

La selección de una tecnología de remediación específica para el sitio y los criterios de desempeño son un desafío en la búsqueda de la limpieza ambiental; la cuestión del enfoque se aborda examinando los procesos físicos, biológicos y químicos que se encuentran en la descontaminación del suelo; sin embargo la bioremediación con aplicación bacteriana, hongos, la fitorremediación con el uso de plantas y la vermiremediación con el uso de lombrices viene generando amplias expectativas en la recuperación de suelos debido a su bajo costo y a su condición amigable con el ambiente, sin embargo es importante considerar ciertos factores tanto físicos, químicos como biológicos que podrían afectar a las especies relacionándolas con la cadena trófica, para conservar el suelo y proteger la salud humana y el medio ambiente (Okoh, et al., 2019).

Capítulo I. Planteamiento del problema

1.1 Descripción de la realidad problemática

Actualmente la industria petroquímica genera grandes problemas ambientales con repercusiones en el equilibrio ecológico y en cosechas de diversos cultivos de la selva peruana, lo que conlleva a grandes pérdidas económicas y dejando niveles muy críticos para el ecosistema. Uno de los problemas que se da es la contaminación, la Amazonia es afectada por un incremento excesivo del derrame de Hidrocarburo en el Oleoducto Norperuano, afectando el ecosistema Amazónico como la reducción y la inhibición de desarrollo de especies vegetales siendo originario de los problemas más serios que sufre el país lo que lleva a conflictos sociales y una lucha por el cuidado de miles de hectáreas de cultivo vegetal (Goyenola, 2018).

Entre 2000 y 2019, se registraron al menos 474 derrames de hidrocarburos en la región amazónica, según León y Zuñiga (2022). De estos, el 65.4% fueron causados por errores humanos y fallas en la infraestructura, el 28.8% por actividades antropogénicas como sabotajes, y solo el 5.8% por causas naturales. Las operaciones y el mantenimiento fueron responsables del 81% de los derrames. En el bloque petrolero, que abarca la frontera entre Perú y Ecuador, se identificaron aproximadamente 1,200 puntos contaminados que necesitan atención.

Por otra parte, la biorremediación es un procedimiento técnico que consiste en el manejo de procesos biológicos en la cual van a participar microorganismos capaces de degradar y recuperar el suelo de otros componentes, donde va involucrar técnicas para reducir la contaminación y en tal escenario va a participar la Biotecnología Ambiental, lo cual juega un papel importante para poder contrarrestar efectos múltiples (Singh, 2017).

La biorremediación puede realizarse y emplear microorganismos lo cual alteraran de manera significativa sus características físicas y química de un lugar contaminado, donde tienen un mecanismo de supervivencia adaptativa y convirtiéndole en fuente energética en condiciones de

procesos aeróbica o en anaeróbicas, este proyecto está enfocado en utilizar la biotecnología como una ruta tecnológica limpia (Leahy & Colwell , 1990).

1.2 Formulación del problema

1.2.1 Problema general.

¿Cuál será la eficiencia de la suspensión biológica de *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus sanguineus* para remediar suelos contaminados con hidrocarburo, 2023?

1.2.2 Problema específico.

- ¿Cuál será la acción de biodegradación de los hongos *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus sanguineus* frente a los suelos contaminados con hidrocarburo?
- ¿Cuál será la eficiencia de biodegradación de hidrocarburo con *Pleurotus ostreatus*?
- ¿Cuál será la eficiencia de biodegradación de hidrocarburo con *Pycnoporus sanguineus*?

1.3 Objetivos de la Investigación

1.3.1 Objetivo general.

Determinar la eficiencia de suspensión biológica de los dos tratamientos *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus sanguineus* para remediar suelos contaminados con hidrocarburos.

1.3.2 Objetivo específico.

- Determinar la acción de biodegradación de los hongos *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus sanguineus* frente a los suelos contaminados con hidrocarburo.
- Determinar la eficiencia de biodegradación de hidrocarburo con *Pleurotus ostreatus*
- Determinar la eficiencia de biodegradación de hidrocarburo con *Pycnoporus sanguineus*

1.4 Justificación de la Investigación

Hoy en día, se ha reportado un incremento en los casos de daños causados por hidrocarburos en los suelos, convirtiéndose en un problema de difícil solución e, incluso, irreversible, ya que muchos procesos de descontaminación no logran ser completamente efectivos. Además, el cambio climático está exacerbando estos efectos, lo que lleva a la pérdida del crecimiento vegetal y afecta negativamente a la fauna que habita en esos ecosistemas. De esta manera el proyecto busca dar nueva información a

los pocos trabajos realizados en cuanto a la biorremediación con hongos de la podredumbre blanca y que es de fácil acceso y lo podemos encontrar en maderas en estado de pudrición, en lugares húmedos o en lugares montañosos en donde estos hongos superiores se observan a plena vista.

Existen diversas técnicas para la biorremediación; sin embargo, algunas de ellas alteran sus características físicas y químicas e implican un alto costo. Por este motivo, el proyecto ofrece un tratamiento biológico que no afectará la biodiversidad, será de fácil acceso y de bajo costo a las comunidades afectadas con el problema de la contaminación sin resolver, dándoles así una alternativa rentable sin ningún perjuicio, no solo del ecosistema sino de los cultivos agrícolas ya que, es el sustento diario en su alimentación y de gran valor económica, para la cual el proyecto que se realizará implicará una actividad calificada de tratamiento libre contra la contaminación. La aplicación de este nuevo tratamiento es garantizar una rápida efectividad en cuanto a la descontaminación de maximizar una respuesta positiva y disminuir lo negativo en lo cual el resultado sea aceptable en la productividad y convertirse en un producto adecuado con la disponibilidad en el mercado nacional.

1.5 Delimitación del estudio

El proyecto se elaboró y llevo a cabo en el laboratorio de Biotecnología de la Producción Vegetal, que pertenece a la Facultad de Agronomía e Industrias Alimentarias de la U.N.J.F.S.C. Este laboratorio contó con una infraestructura adecuada que facilitó el desarrollo de la investigación, optimizando el uso de equipos y reactivos disponibles. Asimismo, los materiales biológicos (basidiomicetos) provenientes de la provincia de San Juan Bautista – Loreto fueron transportados para el secuenciamiento de gDNA y el PCR, el cual se realizó en dos partes: en BTS Consultores SAC, en Lima, Perú, y el secuenciamiento específico en la empresa Bio Basic Inc (corporación de Ciencias de Canadá). Para detalles del procedimiento, consulte la sección 3.3.1.10, y para los resultados de Barcoding, consulte la sección 4.4 y el ANEXO 03. Los resultados logrados de la cromatografía de gases de los suelos se obtuvieron mediante el servicio de la empresa SLab, laboratorio de ensayo e investigación, ver ANEXO 04.

1.6 Viabilidad del estudio

El proyecto de investigación estará centrado en la aplicación de herramientas biotecnológicas mediante métodos en condiciones de laboratorio empleando la utilidad de los basidiomicetos, donde se contará con los recursos económicos, infraestructura, se reportarán los datos actualizados y completos de los resultados.

Capítulo II. Marco teórico

2.1 Antecedentes de la Investigación

2.1.1 Investigaciones internacionales.

Bedoya, Hernando (2018) ejecutaron un estudio in vitro para evaluar la capacidad de los macrohongos filamentosos en la biorremediación de petróleo crudo, obtenido de suelos contaminados en Tumaco (Nariño), Acacias (Meta) y Yondo (Antioquia). Lograron aislar las cepas *Neosartorya spp.* cepa A/N-1, *Aspergillus spp.* cepa Y/As-3 y *Rhizomucor spp.* cepa 1A/R-1. Con estas especies, implementaron una técnica de landfarming modificado, alcanzando una efectividad del 100% en la biorremediación de petróleo pesado en un periodo de dos a diez días. Además, determinaron que la actividad degradativa se debía a la acción de la enzima peroxidasa.

Por otro lado, Blanco, González y Martín (2004) se centraron en el procedimiento de suelos contaminados con hidrocarburos utilizando microorganismos. Describieron diversos métodos de biorremediación que emplean técnicas con microorganismos, tratamientos fisicoquímicos in situ y biológicos, así como tratamientos térmicos ex situ, fisicoquímicos y biológicos mediante dilución. Estos procesos operan a través de la atenuación natural, tanto activa como pasiva. Además, abordaron las limitaciones en la difusión del oxígeno y algunos contaminantes, así como la cinética de biodegradación de estos compuestos orgánicos en sistemas de suelos, especialmente en suelos compactados.

Cevallos y García (2018) llevaron a cabo ensayos con tratamientos combinados, donde analizaron TPHs y HAPs utilizando los métodos EPA 8015 y EPA 8270, respectivamente. Además, realizaron análisis fisicoquímicos para medir el pH y la conductividad eléctrica, añadiendo agua destilada a los tratamientos. La humedad en los tratamientos fue de 1.48%, con algunas variaciones. El tratamiento T5 mostró el mayor porcentaje de remediación, alcanzando un 58.57%. La temperatura varió entre 6.73 °C y 16.53 °C, con

fluctuaciones mínimas. En cuanto al pH, los valores se mantuvieron casi neutros, variando de 7.14 y 7.20, siendo el tratamiento t-3 el que presentó el potencial de hidrogeno más alto con 7.20. La conductividad eléctrica osciló en 0.0026 dS/m y 0.0029 dS/m, con el tratamiento t-2 mostrando el valor más alto de 0.0029 dS/m. Se observó que la biorremediación se relaciona con la transferencia de electrones, donde algunas enzimas obtienen energía utilizando oxígeno y nitratos, transformándolos en carbono, agua y biomasa. Los valores de biodegradación alcanzaron el 44% y 42%, destacando que *Pseudomonas aeruginosa* mostró resultados favorables al utilizar los anillos aromáticos del petróleo como fuente de carbono en los tratamientos de laboratorio.

Carlos (2015), investigó la producción de PHA en suelos contaminados con hidrocarburos. Utilizó residuos agrícolas compostados como SMC y HWC, que tienen alto contenido de CaCO₃ y conductividad eléctrica (10.4 y 11.6 dS, respectivamente), así como bajo contenido de material orgánica y carbono, con valores cercanos de umbrales para enmiendas orgánicas según la ley española 824/2005. Los valores de C/N fueron aproximadamente 10. Estos materiales presentaron porcentajes similares de S. GWS y LGC1681, que contienen lodo de aguas residuales en su composición, con alta materia orgánica (50-60%), y alrededor del 25% de su contenido procedente de carbono. También mostraron similitudes en pH, ausencia de carbonatos y alta conductividad eléctrica.

Garzón, Hernández y Rodríguez (2017) realizaron una revisión adecuada bibliográfica sobre la biorremediación y su impacto en el desarrollo sostenible, evaluando sus posibilidades y limitaciones en la descontaminación. Concluyeron que, desde los tiempos de 1970, la biorremediación ha demostrado ser una tecnología eficiente y rentable para eliminar ciertos contaminantes.

En su investigación, Martínez et al. (2006) aislaron cepas fúngicas de *Penicillium*, *Absidia* y *Mortierella* en los suelos de la septima Región de Chile. Seleccionaron y recopilaron las cepas Dd202 y Dd219 de *Mortierella spp.* y Dd225 de *Penicillium sp.* por la gran capacidad de crecimiento en medios con 1% de petróleo crudo. Durante 36 días, estas cepas degradaron componentes del petróleo, con la cepa Dd225 de *Penicillium sp.* sobresaliendo por su capacidad de descomponer una mayor variedad de componentes.

García, Medina y Paracaguán (2014) llevaron a cabo un trabajo de aislamiento de microorganismos autóctonos del suelo contaminado de la zona de bahía de Amuay (Venezuela). Identificaron tres tipos de macrohongos filamentosos del género *Aspergillus spp*: *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger*. Estos hongos fueron cultivados en un biorreactor para biorremediar suelos contaminados con petróleo, con un tratamiento ex situ de 30 días. Los resultados mostraron que estas especies tienen un potencial degradador significativo de hidrocarburos totales de petróleo (HTP), logrando una remoción superior al 85%. *Aspergillus niger* destacó por su rapidez en la degeneración de los hidrocarburos en comparación con las demás especies.

2.1.2 Investigaciones nacionales.

En su estudio, Analiz (2016) evaluó su capacidad de remoción de Cu y zinc por 4 especies de basidiomicetos de la podredumbre blanca en medios acuosos en Rupa Rupa, Huánuco. Las especies *Ganoderma applanatum*, *Pycnoporus sanguineus*, *Schizophyllum commune* y *Pleurotus ostreatus* fueron aisladas y probadas con concentraciones y diluciones de 10, 30 y 50 mg/L de Cu y Zn. Se observó el crecimiento de biomasa micelial en el 2% del V del medio acuoso. La remoción de cobre varió entre 95.04% y 96.77%, destacándose *P. sanguineus*. La eliminación de zinc osciló entre 97.96% y 99.05%, siendo *P. ostreatus* el más eficaz. La centralización empleada de 50 mg/L resultó en el mayor promedio de remoción, alcanzando el 95.14%.

Por otro lado, Olivera Campos (2020) investigó la biorremediación por agentes contaminantes por hidrocarburos administrando *Aspergillus spp* y *Acinetobacter spp*. en Chiclayo, Perú. Los resultados mostraron que el pH aumentó más con *Aspergillus* en comparación con *Acinetobacter sp*. Sin embargo, la conductividad fue mayor con *Acinetobacter sp*. en comparación con *Aspergillus*. La materia orgánica disminuyó más en los recipientes con *Acinetobacter sp.*, debido a su mayor contacto con el suelo. La contaminación por hidrocarburos disminuyó más significativamente con *Aspergillus* que con *Acinetobacter sp.*, logrando la descomposición de los hidrocarburos en seis semanas.

Rodríguez (2018) evaluó la capacidad de *Pycnoporus sanguineus* para eliminar Pb y Cu en medios acuosos usando biorreactores Air Lift. Se probaron varias concentraciones de Pb y Cu, tanto individualmente como conjuntamente, con un control y tres repeticiones durante 7, 15 y 20 días. Las

condiciones óptimas de pH entre 6.3 y 7.8 permitieron una alta eficiencia de remoción. Pb se eliminó en un 99.89% a los 7 días y Cu en un 91.19% a los 20 días, en presencia de un solo metal. En combinación, Pb (100 mg/L) + Cu (200 mg/L) alcanzaron una remoción del 99.87% y 99.35% a los 7 y 20 días, respectivamente.

Por otro lado, Sifuentes (2014) investigó el crecimiento y desarrollo de *Pleurotus ostreatus* en medio sólido para producir inóculo fúngico y su desarrollo en suelos contaminados con petróleo crudo. La bioenergía de *P. ostreatus* se cultivó en granos cebada y trigo y se midió mediante microscopía. El inóculo primario en trigo mostró un crecimiento de micelio de 1210.40 cm/g. En el inóculo secundario, el crecimiento fue de 106,000 cm/g en trigo y 105,3.60 cm/g en cebada, sin ninguna diferencia significativa entre ambos inóculos. Los procesos con cebada lograron considerables niveles de colonización en suelo, pero no se observaron aumentos significativos del crecimiento del micelio al añadir torta de soya y aserrín como suplementos.

2.2 Bases teóricas

2.2.1 Contaminantes de suelos.

El suelo se define como una entidad tridimensional viva, compuesta por minerales, agua, aire y una fracción orgánica, además de micro y macro fauna que degradan la materia en el suelo. Normalmente, el suelo mantiene un equilibrio de sustancias orgánicas e inorgánicas que podrían ser peligrosas para los humanos. Sin embargo, solo se considera contaminación del suelo cuando estas sustancias alcanzan niveles que amenazan la vida humana y los ecosistemas ambientales. Aunque algunas de las sustancias pueden encontrarse de forma natural, muchas provienen de actividades ilegales humanas como la minería, la explotación petrolera, la agricultura, la industria y el mal manejo inadecuado de residuos sólidos y aguas residuales en las ciudades, entre otros (Magueda, 2003).

2.2.2 Hidrocarburos.

Son un grupo de compuestos lo cual está conformado por átomos de C y nitrógeno, basado en una estructura molecular de un armazón de átomos de carbono que se unirán a átomos de hidrogeno, son

compuestos básicos orgánicos pueden dividirse en cuatro grupos; hidrocarburos alifáticos, cíclicos aromáticos orgánicos polares (Escalante, 2000).

2.2.3 Generalidades de Basidiomicetos.

Su naturaleza es indeterminadamente simple, su cuerpo fructífero está relacionado de células llamadas hifas lo cual presentan 2 micras de diámetro aproximadamente donde poseen ramificaciones y paredes constituida por quitina (NOVA, 2006). Su reproducción se da por medio de esporas (Herrera & Ulloa, 1990).

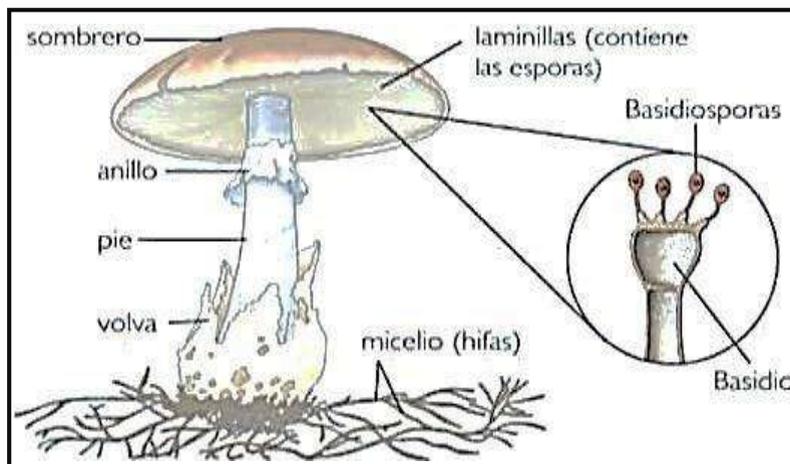


Figura 1. Anatomía de un hongo Basidiomiceto. Fuente: Herrera & Ulloa, 1990.

2.2.4 Mecanismo enzimático de los Basidiomicetos.

El hongo de la pudrición blanca está conformado por un sistema enzimático compuesto por lignina P (LiP), (MnP) (LAC). La LiP oxida veratril alcohol y compuestos orgánicos aromáticos no fenólicos mediante H_2O_2 , mientras que la MnP oxida componentes carbólicos de la lignina convirtiendo Mn^{2+} en Mn^{3+} . La lacasa, un fenol oxida el Cu, oxida los anillos de la Li (Pointing, 2019). Estos hongos son significativos por su competencia para degradar una amplia gama de contaminantes tóxicos orgánicos y sustancias químicas persistentes en el entorno ambiental, como clorofenoles, dioxinas, aminos aromáticas, fenoles organofosforados e hidrocarburos HAPs (Floriani, 2009).

2.2.5 Hongo ostra o seta: *Pleurotus ostreatus*.

Pleurotus ostreatus es un hongo saprófito de pudrición blanca, conocido por sus grandes capacidades lignolíticas, rápido crecimiento y de un manejo factible en campo. El micelio de *P. ostreatus* es blanco, crece radialmente y pronto se asemeja al algodón, formando una capa delgada y firme. Sus setas tienen un pie lateral, dándoles una apariencia en aspecto de ostra u oreja. El nombre *Pleurotus* se origina del griego "pleura" (lado) y del latín "otus" (oreja). En esta investigación, se trabajará con el micelio del hongo sin desarrollar cuerpos fructíferos.

Clasificación taxonómica (Base de datos taxonómica de UniProt):

Clasificación taxonómica (Base de datos taxonómica de UniProt):

Dominio: Eukaryota

Reino: Fungi

Phyllum: Basidiomycota

Clase: Homobasidiomicetos

Orden: Agaricales

Familia: Pleurotaceae

Género: Pleorotus

Especie: *Pleorotus ostreatus*

2.2.6 Hongo Saprobiótico: *Pycnoporus sanguineus*.

Pycnoporus sanguineus es un hongo saprófito de pudrición blanca descubierto en la isla de Guana, Islas Vírgenes, y presente en todos los trópicos, habitualmente en maderas muertas. Aunque es comestible, puede ser tóxico. Pertenece a la familia Polyporaceae, conocida por incluir hongos altamente ligninolíticos y eficaces degradadores de madera. *P. sanguineus* se reconoce fácilmente por su color anaranjado intenso y es común en troncos de parques y plazas urbanas (Boukhris, Gimberti, & Lomascolo, 2011).

Clasificación taxonómica (Base de datos taxonómica de UniProt):

:Reino: Fungi

División: Basidiomicetos

Clase: Agaricales

Subclase: Aphyllomycetidae

Orden: Polyporales

Familia: Polyporaceae

Género: Pycnopus

Especie: *Pycnopus sanguineus*



Figura 2. *Pycnopus sanguineus*. Fuente: Rodríguez, 2018.

2.2.7 Importancia de los basidiomicetos.

Tiene una gran importancia en el ecosistema por su gran capacidad descomponedora. Otrasson causantes de enfermedades produciéndoles a las plantas, formándose formando setas y habiendo una simbiosis entre hongos y plantas (Agrios, 2005).

Existen además grupos de especies que son para el uso humano, de lo cual tenemos actualmente comercializado el Champiñón (*Agaricus bisporus*), la septa (*Pleurotus sp*). Los hongos son el grupo de organismos más compleja y abundante, lo cual este grupo constituye un reino de numerosas especies, en la actualidad su identificación solo llega al 5 % del total (Andrade, Mata, & Sánchez, 2012).

2.2.8 Normativa de suelos contaminados.

En Perú, el Reglamento de Protección Ambiental para las Actividades de Hidrocarburos MINAM (DS N.º 039-2014-EM) regula la gestión ambiental de estas actividades para mitigar impactos y de promover un desarrollo sostenible. Se basa en la Constitución, la Ley N.º 28611, la Ley del Sistema Nacional de E.I.A, y la Ley Orgánica de Hidrocarburos Ministerio del Ambiente. Este reglamento define especificaciones para proteger el entorno natural y designa a las entidades encargadas de su cumplimiento.

En Perú, el Reglamento para el Transporte de Hidrocarburos por Ductos (D. Supremo N.º 081-2007-EM) exige que los operadores eviten afectar y desintegrar el hábitat de las sociedades nativas y campesinas. Esto se logra incluyendo en los Evaluación de EIA medidas para prevenir, reducir o excluir impactos adversativos sociales, culturales, salud y económicos (MINAM, 2013).

2.2.9 Suspensión Biológica.

Sistema disperso compuesto de aditivos microbianos y de materia activa para experimentos simulados. Materias inertes tanto químico como biológico lo cual producirá un deterioro real o un producto por una mezcla producida de lo cual puede disolverse en soluciones acuosas o líquidos (Glosbe, 2021).

Para la recuperación de suelos contaminados, se utilizan biorreactores que mezclan y airean las suspensiones hasta eliminar los compuestos seleccionados. Este proceso es complejo, ya que las tasas de transferencia pueden disminuir. Inicialmente, el contacto entre contaminante y microorganismo se incrementa, aumentando las altas aceleraciones de transferencia de masa y reacción. Los nutrientes optimizan la biorremediación al proteger el desarrollo y crecimiento microbiano. La mezcla y la aireación ayudan a descomponer los flóculos de tierra y a emulsionar los contaminantes no deseados (Banwari, Jyot, Kuhad, & Mishra, 2001).

2.2.10 Crudo de petróleo.

El petróleo crudo es un conjunto de mezcla de compuestos principalmente de hidrocarburos, que abarca desde gases disueltos hasta compuestos semisólidos no volátiles que hierven a temperaturas superiores a los 1000 °F. Su composición típica incluye 84-87% de carbono, 11-14% de hidrógeno, 0.00-5.00% de azufre y 0.00-0.20% de nitrógeno. La composición exacta del crudo varía según su lugar de origen (Gonzales, 2017).

2.2.11 Biorremediación.

La biorremediación utiliza procesos biológicos de organismos vivos micro y macro, como microorganismos y plantas, para descomponer contaminantes específicos en sustancias inertes (Barcelos, Flores, Mendonça, & Soares, 2011). Esta técnica, definida como "tecnología de

biorrestauración de entornos contaminados con xenobióticos mediante microorganismos", puede usar organismos autóctonos o exógenos, y puede aplicarse in situ o ex situ, en condiciones aerobias o anaerobias (Velasco & Volke, 2002).

2.2.11.1 Biorremediación in situ.

La biorremediación in situ busca crear un entorno propicio para el crecimiento de microorganismos a partir de los contaminantes del lugar. Esto se logra mediante la adición de aire u oxígeno, nutrientes, microorganismos extra y/o humedad, además de la vigilancia y del control de la temperatura y el pH (Escalante, 2000).

2.2.11.2 Biorremediación ex situ.

Los métodos de biorremediación ex situ incluyen la biodegradación en lodos, donde el suelo se mezcla con H₂O, microorganismos y nutrientes para crear un lodo. También abarcan la biodegradación en la fase sólida, donde los suelos se colocan en una celda de tratamiento (compostaje) o sobre membranas impermeables (biolabranza), y se les añade agua y nutrientes. Estos métodos son seguros, ya que dependen de microorganismos biológicos que ocurren de forma natural en el suelo, los cuales son beneficiosos y no representan un riesgo para las personas (Escalante, 2000).

Tabla 1. Ventajas y Desventajas del tratamiento de Biorremediación in situ y ex situ.

	In situ	Ex situ
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> • Da la facilidad de tratar el suelo sin tener que hacer excavaciones o transporte. • Con las técnicas se puede bajar el costo del proceso. 	<ul style="list-style-type: none"> • Menor tiempo de tratamiento y bajo costo. • Seguridad en cuanto al posible proceso de muestrear y elaborar una técnica adecuada.
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> • Mayor tiempo en el proceso y tratamiento. • Inseguro en cuanto a las características del suelo. • Deficiencia a la hora de verificar el proceso. 	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento de costo en tratamiento y equipos. • Manejo del material en cuanto a la estructura del suelo y posible exposición de contaminación.

Elaboración propia

2.2.12 Basidiomicetos como Biorremediadores.

La gran parte de los análisis e investigaciones se focaliza en la capacidad de los hongos de pudrición blanca, como *Pleurotus ostreatus* de la familia *Phanerochaetaceae*, para degradar la lignina mediante una enzima extracelular que requiere peróxido de hidrógeno (Frazar, 2000). Estos hongos son únicos entre los eucariotas por degradar la lignina sin utilizarla como fuente de carbono (Sullia, 2003). Pueden transformar diversas moléculas orgánicas y metales entre formas móviles e inmóviles, aunque no pueden destruir los metales (Gadd, 2001).

2.2.13 Regiones ITS1 – ITS4

Los datos de análisis moleculares más utilizados para el reconocimiento filogenética, taxonómica de los hongos se basan en el estudio de regiones específicas del genoma, como ITS1 e ITS2, ubicadas entre los genes del ARNr 28S y 18S. El ITS, que incluye las regiones ITS1 e ITS4 separadas por el gen 5.8S, puede ser amplificado con primers específicos (Cázares, Garza, & Guevara, 2004).

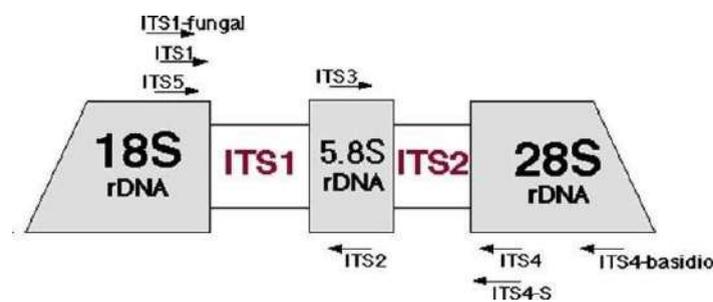


Figura 3. Agrupamiento de genes ARNr y posiciones de los primers de PCR de hongos (Higgins, 2012).

La región ITS es ideal para la obtención de la identificación molecular de hongos debido a su tamaño (600-800 pares de bases), facilidad de amplificación con primers universales, y alta variabilidad entre especies distintas. Los genes multicopian del ADN ribosomal permiten amplificar la región ITS incluso a partir de muestras pequeñas o degradadas (Bruns & Gardes, 1993).

Ver referencia que los ITS son propios de Hongos White, T.J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>

Pares de primers adquiridos para amplificación de la región ITS en hongos, (Higgins, 2012)

<i>Fw primer</i>	<i>Rv primer</i>	Aplicación
------------------	------------------	------------

ITS1-F	ITS4	Se amplificarán ambas regiones ITS1 e ITS2 de cualquier hongo, ya que la región de ADN a la que se unen está presente en todos los hongos superiores.
ITS1-F	ITS4-B	Se amplificarán ambas regiones ITS1 e ITS2, pero solo de hongos <i>Basidiomycota</i> ya que la región en la cual se une el ITS4-B solo se encuentra en estos.
ITS1-F	ITS4-A	Se amplificará ambas regiones ITS1 e ITS2, pero solo de hongos <i>Ascomycota</i> ya que la región en la cual se une el ITS4-A solo se localiza en estos.
ITS1-F	ITS2	Se amplificará únicamente la región ITS1. No es de gran interés. Se usa cuando el ADN de la muestra está deteriorado o es antiguo.
ITS3	ITS4 / ITS4-B	Se amplificará únicamente la región ITS2. Usado, comúnmente, para conocer contaminaciones por <i>Ascomycota</i> .

2.3 Definiciones conceptuales de términos básicos

2.3.1 Temperatura.

- Temperatura: Es una dimensión física que indica el punto de calor de los cuerpos o del ambiente adecuado, medida en kelvin (RAE, 2019). La temperatura es crucial para el desarrollo de los hongos, que permanecen activos por encima de 0°C. La relación entre temperatura y humedad promueve la proliferación de esporas. La temperatura óptima para el crecimiento fúngico está entre 20 y 35°C, facilitando la absorción de metales y compuestos alifáticos. Por debajo de 0°C, los hongos entran en latencia, y temperaturas superiores a su tolerancia máxima resultan letales (Ruíz, 2016).

2.3.2 Potencial de hidrógeno (pH).

- Potencial de hidrógeno (pH): Es una medición de la acidez o alcalinidad de una solución, el pH diagnostica los niveles de densidad de cationes o iones de hidrógeno [H⁺] en una disolución (Goyenola, 2018). La biodegradación de alcanos a pH neutro se produce con un sustrato alto en nitrógeno, donde la producción de lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa está suprimida (Castro, 2008). Los niveles de pH en los hongos favorecen la bioabsorción, ya que a un pH inferior a 3,5, los grupos fosfato y carboxilo de la pared fúngica se protonan, lo que les confiere una carga positiva o negativa. Esto provoca una repulsión electrostática entre los iones (+) metálicos y la pared fúngica, y compiten P

como el H con los metales. En cambio, a valores de pH superiores a 4 e inferiores a 6, la carga negativa de las paredes fúngicas favorece la interacción de los aniones con los iones metálicos (Ruíz, 2016).

2.3.3 Inóculo líquido.

- Inóculo líquido: es una concentración de microorganismos usada para iniciar un cultivo. En forma líquida, los microorganismos se encuentran en una solución que se añade a un medio o sustrato para su desarrollo y reproducción. Este proceso es común en diluciones seriadas y en el almacenamiento de células viables para su posterior inoculación (Castro, 2018).

2.3.4 Inóculo semilla.

- Inóculo semilla: conocido como spawn, es el micelio vegetativo producido de un hongo estudiado, cultivado en un medio de crecimiento como trigo o soya, ya sea en escalas grandes o pequeñas. Su objetivo es producir una cogida de hongos mediante el preparativo de un cultivo puro y libre de contaminantes a partir de esporas o tejido del hongo. El inóculo abarca el desarrollo del micelio del hongo junto con un medio de soporte que proporciona una alimentación durante su desarrollo (Sharma & Kumar, 2011).

2.3.5 Mineralización de los Hongos.

- Mineralización de los hongos: el tratamiento de suelos contaminados se basa en la mineralización de la acción de contaminantes orgánicos, donde los microorganismos convierten estos contaminantes en CO₂, agua y biomasa. Los basidiomicetos son únicos en su capacidad para biodegradar y mineralizar la lignina (Berger, 2005).

2.3.6 Compuestos recalcitrantes.

- Compuestos recalcitrantes: los metales son compuestos recalcitrantes, como la lignina, hemicelulosa y compuestos aromáticos. Los hongos y bacterias tienen la capacidad de degradar estos compuestos, lo

que confirma su naturaleza inespecífica. Esta característica hace que sean de gran interés para su potencial aplicación e inducción en la industria del papel y la biorremediación, ya que pueden ser degradados y absorbidos (Du, Gao, Liang, Wu, & Yang, 2010).

2.3.7 Humedad.

- **Humedad:** es un componente del clima junto con la temperatura y la presión atmosférica, se refiere a la alta suma de cantidad de vapor de H₂O en atmósfera. En el suelo, es un indicador importante para diversos análisis, declarados como la proporción de masa de humedad respecto a la masa de una muestra de suelo secado a peso constante, o como el volumen de humedad reciente y presente. Hay métodos simples para medirla que no necesitan equipos especializados (Cimmyt, 2013).

2.3.8 Hidrocarburos totales de Petróleo (THP Fracción 1).

- **Hidrocarburos totales de Petróleo (THP F- 1):** ocurre cuando la cantidad de hidrocarburos supera la capacidad de los microorganismos para degradarlos, resultando en su adhesión a partículas de suelo o sedimentos y afectando la calidad del suelo (Cevallos y García, 2018). Las fracciones de TPH F1 se determinan mediante extracción con hexano, comparando con patrones de compuestos orgánicos no volátiles y semivolátiles, y se miden en cadenas cortas hasta niveles por debajo de 2500 mg/kg para suelos agrícolas (Rodríguez, 2017).

2.3.9 Xenobióticos.

- **Xenobióticos:** se conoce la gran capacidad degradadora de los basidiomicetos y de microorganismos sobre compuestos xenobióticos que son sustancias ajenas que no se producen naturalmente, como por ejemplo, las plaguicidas, hidrocarburos, aerosoles; es por tanto, el estudio de ciertos organismos capaces de biorremediar ambientes contaminados debido a que asimilan éstos componentes y gracias a enzimas catalíticas como lacasas, lipasas transforman y eliminan los compuestos xenobióticos en moléculas más simples, pudiendo biorremediar la contaminación al reducir los niveles tóxicos y algunos hongos como los de poredumbre de madera incrementan su potencial biorremediador al co-

metabolizar sustratos como la lignina y la celulosa durante la biorremediación de sitios contaminados (Torres, 2020).

2.3.10 Surfactante.

- Surfactante: el uso de polvo oleofílico absorbente del lirio acuático es un método efectivo de remediación ambiental, que capta y mitiga contaminantes. Los absorbentes naturales, con mínimo impacto ecológico, inmovilizan contaminantes actuando como "esponjas" que los retienen y separan del agua o suelo. Este complejo polvo-contaminante puede ser utilizado para el crecimiento y degradación mediada por hongos (Torres, 2020).

2.3.11 Gravimetría.

- Gravimetría: es una técnica analítica cuantitativa, aplicada para determinar la proporción de sustancia midiendo la masa de la muestra, se emplearía para determinar la biomasa fúngica por peso seco, el cual consiste en secar la muestra empleando calor seco (estufa) y luego ser cuantificado en una balanza (Rodríguez, 2017).

2.3.12 Estructura del suelo

- Estructura del suelo: puede afectar en el ingreso del aire agua y nutrientes en lo cual la movilidad del contaminante será más eficaz en su biodegradación; caso contrario, en los suelos con permeabilidad a oxígeno, nutrientes y movimientos de agua forma estructuras duras en lo cual la disponibilidad del microorganismo sea persistente en el ambiente (Vidali, 2001).

2.4 Formulación de Hipótesis

2.4.1 Hipótesis general.

La eficiencia estará determinada por la suspensión biológica de *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus sanguineus* donde remediara eficientemente los suelos contaminados con hidrocarburo.

2.4.2 Hipótesis específica.

- Los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Pycnoporus sanguineus* tendrán acción de biodegradativa de hidrocarburo en suelos contaminados.
- La biodegradación de hidrocarburo será eficiente con *Pleurotus ostreatus*
- La biodegradación de hidrocarburo será eficiente con *Pycnoporus sanguineus*.

2.4.3 Operacionalización de variables e indicadores.

Tabla 2. Operacionalización de Variables e Indicadores.

VARIABLES	DEFINICIÓN	DIMENSIONES	INDICADORES	ÍNDICES
V. I Acción del Hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>Pycnoporus sanguineus</i>	Degradación de hidrocarburo presentes en suelos, demostrando su capacidad biodegradativa como alternativa limpia y favorable con el ambiente, a través de método fisicoquímicos, alta capacidad de remoción en hidrocarburo	Contaminante	Tierra contaminada de hidrocarburo	mg
		Tipo de inóculo	Micelio de hongos	mg
V.D Biorremediación del suelo contaminado	Uso de microorganismos vivos y enzimas libres, para obtener una transformación parcial o mineralización de los compuestos xenobióticos o recalcitrantes mediante métodos fisicoquímicos	Concentración final (cf) del petróleo	> 6000 pS	mg/kg
		Eficiencia del tratamiento	0 - 100	Porcentaje (%)

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3. Variables experimentales.

Variable experimental	Método	Instrumento
Petróleo	Soxhlet	Equipo Soxhlet
pH	Potenciometría	pH metro
Humedad	DEANK- STARK	Horno al vacío – balanza
Temperatura	Observación experimental	Termómetro

Fuente: Elaboración propia.

Capítulo III. Metodología de la investigación

3.1 Diseño metodológico

3.1.1 Tipo de investigación.

La investigación fue de tipo explicativa por que buscó brindar soluciones mediante suspensiones fúngicas recuperando ambientes contaminados por hidrocarburo.

3.1.2 Nivel de investigación.

Presentó un nivel de investigación **experimental** por lo que buscó inhibir el daño causado por factores de compuestos químicos complejos mediante controles biológicos.

3.1.3 Enfoque.

El enfoque es cualitativo y cuantitativo ya que se tuvo en cuenta un procedimiento donde se midieron y se emplearon análisis estadísticos para su respectivo análisis.

3.2 Población y muestra

3.2.1 Población.

La población fue compuesta por dos especies de hongos de la podredumbre blanca (*Pycnoporus sanguineus* y *Pleurotus ostreatus*) que fueron recolectados de árboles en estado de pudrición localizado en puertas almendras, distrito de San Juan Bautista, provincia de Maynas con una latitud de -3.82867 y una longitud de -73.37766 - Loreto, las cuales se seleccionaron a las que se encontraban en condiciones viables para el trabajo de investigación.

3.2.2 Muestra.

Las muestras se tomaron de manera aleatoria simple (MAS) por que a partir de las poblaciones se obtuvieron una muestra al azar con lo cual se trabajó y así se obtuvo la misma probabilidad de ser elegida lo cual fueron 10 muestras de cada especie con un tamaño de 5cm de diámetro que fueron recolectadas en bolsas de polietileno de 18x25cm. Y mediante lo cual también se obtuvieron muestras de suelo contaminado con petróleo con la ubicación de latitud -4.601738187230421, y longitud -77.89009, dando un peso total de 5kg puestas en bolsas de polietileno de 20x30cm, lo cual fue uniformizado y caracterizado para su siguiente simulación para luego ser llevado al laboratorio.

3.2.2.1 Procedimiento para la recolección de los especímenes.

- **P1.** Para la elección de las especies a evaluar y monitorear se descartaron palmeras y arbusto, considerando únicamente los árboles.
- **P2.** Se registraron los árboles mediante el uso de un GPS donde se tomaron coordenadas.
- **P3.** Se realizó la caracterización macroscópica evaluando las siguientes características: color, margen, forma, estípites (en caso de presentarlo) tubos, basidioma, píleo, color, de las láminas, presencia de cortinas, restos de velo, escamas, entre otros.
- **P4.** Recolección de basidiomicetos y basidiocarpo se llevó a cabo utilizando una cuchilla para extraer un diámetro de muestra de 5cm con una cuchilla, donde se guardó en una bolsa de polietileno y otra de papel marcado con código y fecha.
- **P5.** Se conservó las muestras, cubrió de papel periódico y se colocaron al interior de bolsas etiquetadas de papel periódico para protegerlas de posibles daños, alta húmedas, insectos o mohos
- **P6.** Además se registraron las características del lugar y hábitat, tipo de bosque y de substrato en el que se desarrollaron y se tomaron fotografías con la finalidad de no perder sus características principales y originales.

3.2.2.2 Reconocimiento de signos.

Se realizó a través de la caracterización morfológicas de los basidiocarpos mediante descripción bibliográfica registros reportados, registros fotográficos y claves dicotómicas de Basidiomicetos, apoyados en evidencia de patógenos registrados en Perú, por SENASA (Torres, 2020) y (Manta, Orellana, & Torres, 2014).

3.3 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.3.1 Técnicas a emplear.

3.3.1.1 Preparación de medio de cultivo.

El medio de cultivo que se utilizó para el cultivo de los hongos de pudrición blanca *Pycnoporus sanguineus* y *Pleurotus ostreatus* fue el medio Agar Papa Dextrosa (PDA).

Para el preparado de 1litro de medio PDA se utilizó 39g de medio comercial, en lo cual se prepararon en dos matraces de 500ml y constantemente se removió con una bagueta para el homogenizado total y se llevó a la autoclave a 15lb de presión, 121°C durante 15minutos.

3.3.1.2 Plaqueo.

Una vez autoclavado el medio PDA se llevó a cámara de flujo laminar junto con el material estéril (placas Petri), seguidamente se agregó 0.3mg de antibiótico (cloranfenicol de 500 mg) adquirida de la farmacia Inkafarma, homogenizando/movimiento ligeramente y posteriormente se inició el plaqueo, una vez terminado se llevó a incubar las placas a 30C° por 24h para observar si hubo contaminación.

3.3.1.3 Desinfección y siembra.

Los hongos recolectados fueron seccionados en pequeños trozos 0.5cm x 0.5cm lo cual se desinfectaron inmediatamente mediante el protocolo recomendado por Córdova, (2010) y Ruíz, (1990); utilizando (NaOCl) en una proporción de 1:10 por 1 min, y una vez desinfectado se secaron con papel toalla.

Para la propagación de los hongos seccionados se emplearon la técnica de cultivo al método de siembra en placa, donde se procedió a propagar los cortes realizados manualmente, en medio de la placa para tener un crecimiento adecuado, PDA (1L) para el caso *Pycnoporus sanguineus* la propagación se realizó bajo condiciones de oscuridad a 25°C, *Pleurotus ostreatus* a ambiente normal, las placas Petri se incubaron a 27°C, se sellaron con papel film con hora y fecha, se hicieron observaciones diariamente para ver el estado de crecimiento y se tomarán medidas encada observación y se hizo anotaciones para considerar el desarrollo hasta que invada totalmente la placa, el procedimiento que se va realizar para la propagación se efectuó en una cabina de flujo laminar.

3.3.1.4 Preparación de inóculo primario de *P. ostreatus*.

Para la propagación del micelio se utilizó 1/8 de la placa con el micelio contenido que fue diluido en 10ml de medio líquido PDA, en cada bolsa se inoculó 10ml de la preparación con sustrato (bagazo) totalmente estéril para las condiciones de crecimiento. Las bolsas de polipropileno de 5x10cm fueron incubados a 25°C durante tres semanas.

3.3.1.5 Preparación de inóculo secundario.

Pasado las tres semanas una vez obtenido el inóculo primario, se utilizó un nuevo grupo preparado y esterilizado para repetir siguiendo el mismo procedimiento primario, este segundo grupo serán bajo las mismas condiciones.

3.3.1.6 Preparación de inóculo de *P. sanguineus*.

Se utilizaron granos de trigo, la cual se esterilizaron y se le agregaron 12g de (CaSO₄·2H₂O) y 3g de (CaCO₃); esto evitó que las semillas se fueran a pegar y así mismo corrigió el pH. Unavez estériles las bolsas frías se le inocularon el cultivo micelial, en una cámara de flujo laminar, con las esporas inoculadas se incubaron a 25°C bajo condiciones de oscuridad por ocho días.

3.3.1.7 Preparación de Peptona-Sacarosa.

En un matraz Erlenmeyer de 2L se colocó 1L de agua destilada y se adicionó 20g de sacarosa y 20g de peptona de caseína, se agitó el matraz y se llevó a la autoclave para su esterilización a 121°C y 15libras por 30 min. Una vez acabado la esterilización se incubaron a 28°C durante 24 h para observar si no presentó ninguna contaminación a la hora del trabajo, se puso en refrigeración para el trabajo.

3.3.1.8 Recuento de esporas/mL en cámara de Neubauer.

Se diluyeron los hongos cultivados de *Pycnoporus sanguineus* y *Pleurotus ostreatus*, sobre un tubo con 10mL de agua destilada estéril, se agitó manualmente hasta homogenizar; posteriormente se sacaron con una micropipeta de 100uL para el recuento de esporas/g en la cámara de Neubauer, se determinó el número de esporas siguiendo la metodología propuesta por (Bustillo, 2010).

3.3.1.9 Extracción de ADN para *Pleurotus ostreatus*.

La extracción del ADN se realizó con el kit E.Z.N.A® Fungal DNA Mini Kit según el protocolo para tejidos congelados. Se diluyó el buffer de lavado con etanol, se precalentaron agua desionizada y el buffer de elución a 65 °C, y se etiquetaron tubos Eppendorf y columnas HiBind®. Se colocaron 100 mg de micelio pulverizado en un tubo Eppendorf con 600 µL de FG1 Buffer, se mezcló y se incubó a 65 °C por 10 minutos. Luego, se añadieron 140 µL de FG2 Buffer, se enfrió en hielo por cinco minutos

y se centrifugó. El sobrenadante se mezcló con isopropanol y se centrifugó nuevamente. Tras eliminar el sobrenadante, se añadieron agua desionizada caliente y RNAsa A, seguidos de FG3 Buffer y etanol. La muestra se transfirió a una columna HiBind®, se lavó con Wash Buffer y el ADN se eluyó con buffer precalentado, almacenándose a -20 °C.

Posteriormente, se cuantificó el ADN con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 para asegurar su pureza y cantidad antes de la PCR, siguiendo el protocolo de Conklin & Desjardins (2010). Se limpiaron las superficies ópticas, se seleccionó la aplicación de ácidos nucleicos en el software NanoDrop y se midió la concentración y pureza del ADN.

La PCR se realizó para amplificar las regiones ITS de los hongos (600-800 pb) (Bruns & Gardes, 1993). Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1x. La agarosa se disolvió en TAE 1x, se añadió Red Safe, y se vertió en un portageles. Tras solidificar, el gel se colocó en la cubeta de electroforesis y se cubrió con buffer TAE 1x.

Tabla 4. Formulación del gel de agarosa al 1%

Componente	Cantidad
TAE 1 x	140 mL
Agarosa	1,4 g
<i>Red Safe</i>	7 µL

PCR Y ELECTROFORESIS

En la electroforesis realizada se aplicó el par de primers ITS1-F/ITS4 para realizar la amplificación de la región común para todos los hongos se utilizó varias especies de *Pleurotus spp* para poder identificar al *Pleurotus ostreatus*. Por otro lado, se usó el par de primers ITS1- F/ITS4-B para realizar la amplificación de la región de los hongos se representa lo amplificado, según marcadores moleculareslo cual muestra las cepas híbridas para la identificación de *pleurotus ostreatus*.; carril A Marcador molecular Principal λ HINDIII, carril B, *P. lutescens*: se presenta la cepa prental IE205,carril C, *P.tubaeformis*: CP253, Carril D, *P piricola*: IECP1 (IE2001XCP2636), Carril E, *P. arachidicola*: IECP2

(IE2002XCP2546), Carril F, a *P.eryngii*: IECP3 (IE2004XCP2536), Carril G, *P. cinerea*: IECP5 (IE2005XCP2586), Carril H, *P. oryzae*: CP243 , Carril I: control positivo a *Pleurotus ostreatus* (PO) , carril G: PCM observar resultados (ver Fig.6)

3.3.1.10 Secuenciamiento del material genómico de *Pycnoporus sanguineus*.

Se utilizó un kit comercial de extracción (Presto™ Mini gDNA Yeast Kit, Geneaid BiotechLtd., Taiwan) para ADN hongos, de acuerdo con las indicaciones descritas en su manual. Cada pellet de hongos fue colocado en un microtubo de 1.5 ml y resuspendidos con 600 µl de GT Buffer, luego colocados con 5 µl de ARNasa A (50 mg/ml) en los tubos conteniendo los “beadbeating” (perlas de lisis), llevados a un vórtex con adaptador a máxima velocidad por 10min. Luego se agregaron 100 µl de PR buffer, se mezclan y se incubaron en hielo por 5 min. Después de la incubación se centrifugaron a 11,000 x g por 3 min y se transfirió 450 µl del sobrenadante a un nuevo microtubo de 1.5 ml. Al transferido se agregó 450 µl de GB Buffer y 450 µl de etanol absoluto, se mezcló vigorosamente por 10 minutos. La mezcla se transfirió a las columnas GD con los tubos de colección, se centrifugó a 16,000 x g por 1 min, descartando el fluido y repitiendo el proceso con la mezcla restante sobre la misma columna; una vez descartado todo el fluido se agregaron 400 µl de W1 Buffer sobre la columna GD y se centrifugó a 16,000 x g por 30 segundos, se descartó el fluido y se agregaron 600 µl de Wash Buffer sobre la columna GD, se centrifugó a 16,000 x g por 30 segundos; se descarta el fluido y se centrifuga nuevamente a 16,000 x g por 3 min para secar la columna, en todos los pasos se reutiliza el tubo de colección.

Finalmente, se transfirió la columna GD a un microtubo de 1.5 ml nuevo, se agregó 100 µl de buffer de elución precalentado a 70° C y se dejó incubando por 3 min. Se centrifugó a 16,000x g por 2 min y se guardó el ADN purificado hasta su posterior uso o conservación a -20°C (White, 1990).

Amplificación parcial de la región ITS (hongos):

Tabla 5. Primers utilizados para las amplificaciones de ADN.

Nombre de primer	Secuencia 5´-3´ primers
ITS1-F	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4-R	GCTGCGTTCTTCATCGATGC

Las PCR se realizaron basadas en la literatura con algunas modificaciones de acuerdo los protocolos internos de nuestro laboratorio. Para la amplificación se usó la enzima PCRBIO HiFi Polymerase (PCR Biosystems Ltd., Reino Unido).

Los productos amplificados, fueron purificados con el GenepHlow Gel/PCR Kit (Geneaid, Taiwan), de acuerdo al protocolo del kit. Los productos de PCR purificados fueron enviados a secuenciar por tecnología SANGER a la empresa Bio Basic Inc. (Canadá). Se secuenció usando los primers, White, T.J. (1990).

Nombre de primer	Secuencia 5´-3´primers
ITS1-F	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS2-R	GCTGCGTTCTTCATCGATGC

Las secuencias resultantes fueron analizadas por el programa DNA Baser Assembler v5.08 (Heracle BioSoft, USA) y el servidor BLASTn. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Ver sección 4.4

3.3.1.11 Preparación del inóculo.

En unas bolsas estériles se prepararon soluciones de sustrato (bagazo de caña, aserrín) 250g más 20g de sustrato micelial de *Pycnoporus sanguineus* y *Pleurotus ostreatus*, posterior se homogenizó por 1 min y se adicionó 3mL de homogenizado para la inoculación que contenían los matraces (peptona-sacarosa) en las bolsas de polietileno de 1kg los cuales contuvieron 250g de bagazo de caña más 30g de sustrato micelar (*Pleurotus ostreatus*) y 250g de aserrín más 30g de sustrato micelar (*Pycnoporus sanguineus*), los cuales se incubaron a 27°C por ocho días y se realizó el monitoreo para comprobar el crecimiento micelar, permitiéndonos analizar y cultivar.

3.3.1.12 Preparación de la muestra.

Se trabajó en macetas de 15 x 12cm, antes de proceder a trabajar con el suelo contaminado (500g) se dejó secar durante tres días para garantizar una distribución homogénea, en las macetas de experimentación, se rotularon con un plumón indeleble a las 10 macetas y se procedieron a realizar los siguientes tratamientos: M1-*Pycnoporus sanguineus* (t₀-t₅); y la otra especie M2-*Pleurotus ostreatus* (T₀- T₅) lo cual se trabajó con cinco tratamientos por cada especie.

3.3.1.13 Suspensión de *Pleurotus. ostreatus* y *Pycnoporus. sanguineus*.

Para la suspensión del medio que contiene *Pycnoporus sanguineus* y *Pleurotus ostreatus* en bolsas de sustrato de bagazo, todos los tratamientos contuvieron una inoculación del % del medio, 80% de sustrato y 20% de medio micelial de total de 25g, se esparció uniformemente el inóculo en el suelo contaminado con hidrocarburo.

Una vez inoculado el sustrato micelial en la muestra, cada maceta se cubrió con una tela de tipo gasa más papel de aluminio donde se le perforó unos agujeros para su aireación, las muestras se dejaron a temperatura ambiente y por cada 5 días, se realizó los procesos para la cuantificación de degradación en el equipo de (GC/MS) durante un periodo de 21 días.

3.3.2 Determinaciones fisicoquímicas del suelo.

3.3.2.1 Valor del pH del suelo contaminado con suspensión micelial.

Para la determinación de pH del suelo, se procedió a transferir 10g del suelo contaminado en un frasco de vidrio con boca ancha en la cual se agregó 20mL de agua destilada. Con una varillase realizó una mezcla homogénea mediante agitación manual, durante un intervalo de 5 min, por alrededor de 30 min y luego se puso a reposar por 15 minutos. Al mismo tiempo, se aprovechó para a medir el pH con las soluciones reguladoras (buffer) pH 4.00 y 7.00; 7.00 y 10.0, se enjuagaron los electrodos con agua destilada antes de medir cada muestra. Una vez registradas las lecturas del pH se procedió a interpretar los resultados de acuerdo a NOM-021.

3.3.2.2 Humedad.

Para determinar la humedad, se empleó el método Dean-Stark, de lo cual se va utilizar una trampa para separar el H₂O de una mezcla azeotrópica y medirla en varios tubos graduado. Se combinaron 10.0 g de suelo con 100.0 ml de tebilcenceno en un matraz de bola. La trampa para humedad se ubicó en la boca del matraz y se conectó a un condensador, manteniendo el a temperatura de calor durante 3 hr. La cantidad de H₂O se registró directamente desde la trampa (Juárez, 2014). Se utilizó correctamente la fórmula para calcular la humedad.

Se utilizó la siguiente ecuación para determinar la humedad.

$$\%Humedad = \frac{vDS}{W} \times 100$$

Donde:

- vDS: Volumen de agua leído en la trampa.
- W: Peso de la mezcla/agua.

3.3.3 Eficiencia de Remoción.

Se calculó por cálculo de porcentaje entre la concentración inicial y final del suelo según cada tratamiento evaluado, como indica la siguiente ecuación (Marcovecchio & Moreno, 1991).

$$Er = \frac{Ci - Cf}{Ci} \times 100$$

Donde:

- ER: eficiencia de remoción (%)
- Ci: concentración inicial
- Cf: concentración final

3.3.4 Técnicas para el procesamiento de la información.

Se realizaron análisis estadísticos utilizando un análisis de varianza (ANOVA) con el software Minitab versión 26. Para evaluar las diferencias de los tratamientos, de lo cual se aplicó el método de Tukey con un nivel de significancia de 0.05. Los resultados se presentaron gráficamente mediante líneas de tendencia, con 5 repeticiones por tratamiento. El análisis de varianza reveló distinciones significativas entre los tratamientos aplicados al suelo, permitiendo identificar el tratamiento más efectivo en función de las variaciones en el crecimiento del micelio a lo largo del experimento.

Capítulo IV. Resultados

4.1 Recolección de las muestras de *Pleurotus ostreatus* y *Pycnoporus sanguineus*

La muestra a almacenar se llevó a cabo en varios puntos diferentes debido a la dispersión de la contaminación en el suelo. La ubicación de cada muestra se registró utilizando coordenadas geográficas (ver Figura 4). Datos ambientales de ubicación registrados en la zona de recojo del muestreo.

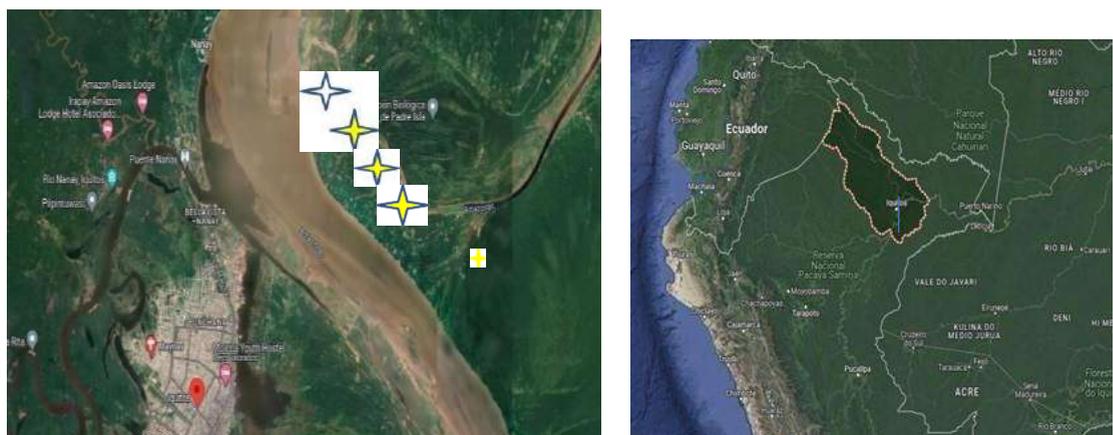


Figura 4. Localización de las zonas de muestreo (puntos amarillos) de suelo contaminado y recolección de los basidiomicetos. Fuente: Google Maps.

4.2 Aislamiento de *Pleurotus ostreatus* y *Pycnoporus sanguineus*

Las muestras biológicas fueron limpiadas y procesadas en condiciones estériles antes de ser

sembradas en medio PDA. Las cepas de *P. ostreatus* y *P. sanguineus* mostraron características coloniales con un tono blanquecino, indicativo de la fase de producción de esporas. Posteriormente, avanzaron hacia la formación de micelio, donde fueron cuidadosamente seleccionadas las cepas más viables para el estudio (Figura 5).

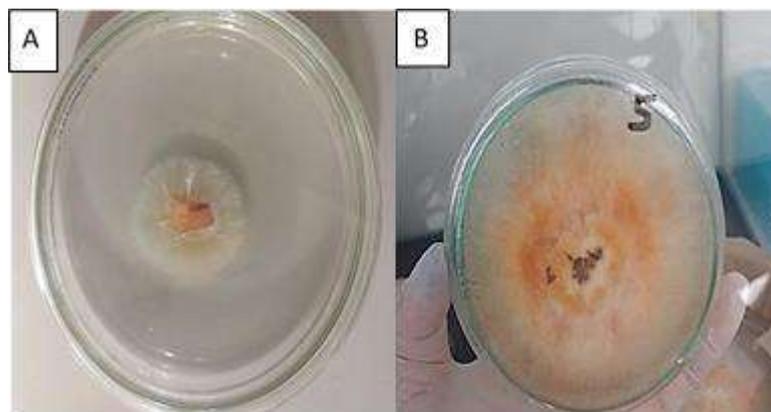


Figura 5. Crecimiento micelial, en medio de cultivo PDA cepas a 27°C lado izquierdo (A). Cepa de *Pleurotus ostreatus* (día 05), lado derecho (B) cepa *Pycnoporus sanguineus* (día 05).

El estudio analizó el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* y *Pycnoporus sanguineus* en un período de 20 días. Para *Pleurotus ostreatus*, se observó que el crecimiento comenzó sin halos (0 mm) en el Día 0, y aumentó progresivamente, alcanzando entre 5 mm y 12 mm en el Día 4, y de 17 mm a 31 mm en el Día 8. En el Día 12, los halos variaron entre 42 mm y 64 mm, y en el Día 16, entre 68 mm y 85 mm. Para el Día 20, los halos llegaron hasta los 90 mm. En contraste, *Pycnoporus sanguineus* también comenzó sin crecimiento el Día 0, y en el Día 4 mostró halos entre 0 mm y 5 mm. El crecimiento se incrementó a 14 mm - 26 mm en el Día 8, 26 mm - 49 mm en el Día 12, y 63 mm - 78 mm en el Día 16. Finalmente, en el Día 20, los halos alcanzaron hasta 86 mm (Tabla 6). Ambos hongos mostraron un crecimiento continuo, con *Pleurotus ostreatus* alcanzando tamaños de halo ligeramente mayores y de manera más uniforme que *Pycnoporus sanguineus*.

Tabla 6. Halos de crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus* y *Pycnoporus sanguineus*, periodo de incubación de 20 días a 27°C bajo condiciones de oscuridad.

HALOS DE CRECIMIENTO												
DIAS DE INCUBACION	<i>Pleurotus ostreatus</i>						<i>Pycnoporus sanguineus</i>					
	placa 01	placa 02	placa 03	placa 04	placa 05	placa 06	placa 01	placa 02	placa 03	placa 04	placa 05	placa 06
	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)
0												
4												
8												
12												
16												
20												

DIA 0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
DIA 4	11	7	5	5	12	7	0	3	4	3	5	5
DIA 8	25	31	17	20	29	22	14	22	19	18	26	20
DIA 12	54	64	47	42	60	49	26	49	35	32	48	45
DIA 16	82	79	70	68	85	78	63	78	72	65	69	67
DIA 20	90	89	79	81	90	89	86	82	84	79	82	85

4.3 Extracción de ADN.

Con la cepa micelial pura obtenida del medio, se procedió a la extracción de ADN siguiendo el protocolo establecido. En la Figura 6, se presentaron los diferentes marcadores utilizados para identificar las cepas híbridas de *Pleurotus ostreatus*. El principal marcador molecular utilizado fue λ HindIII, que tiene un peso molecular de 23,123 kb. Para la identificación precisa del material genético de *Pleurotus ostreatus*, se emplearon varios marcadores específicos de la especie *Pleurotus* spp. En la figura 6, los carriles se organizaron de la siguiente manera: en el Carril A se mostró el marcador molecular principal λ HindIII; en el Carril B, la cepa parental IE205; en el Carril C, la cepa CP253; en el Carril D, la cepa híbrida IEC1 (IE2001 x CP2636); en el Carril E, la cepa híbrida IEC2 (IE2002 x CP2546); en el Carril F, la cepa híbrida IEC3 (IE2004 x CP2536); en el Carril G, la cepa híbrida IEC5 (IE2005 x CP2586); en el Carril H, la cepa CP243; en el Carril I, el control positivo para *Pleurotus ostreatus* (PO); y en el Carril J, el control negativo PCM. Esta organización diferente de cepas híbridas y confirmar la presencia del material genético específico de *Pleurotus ostreatus*.



Figura 6. Extracción de ADN en Gel de agarosa al 0,7% cepas híbridas para la identificación de *Pleurotus ostreatus*.

4.4 Secuenciamiento de *Pycnoporus sanguineus*

Todas las muestras fueron amplificadas y analizadas. Se alinearon las reads correspondientes a cada primer (forward y reverse), resultando en seis reads por muestra. Estas reads generaron una secuencia consenso correcta para cada muestra. Luego, cada secuencia consenso se comparó con la base de datos completa de secuencias reportadas en GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Utilizando el servidor BLAST (Tabla 7), se seleccionó el mejor resultado basado en el mayor puntaje de E-value (igual a 0) y una identidad superior al 99%, considerando únicamente los organismos con nomenclatura binomial completa.

Tabla 7. Las diez primeras especies putativas de acuerdo con su comparación BLAST con la base de datos del GenBank.

#	Max score	Total score	Query cover	Evalue	Porcentaje de identidad	Especie putativa	N° de accesoión
1	488	488	99%	3e-133	98.56%	<i>Trametes sanguinea</i>	MT584659.1
2	488	488	99%	3e-133	98.56%	<i>Trametes coccinea</i>	ME377427.1
3	488	488	99%	3e-133	98.56%	<i>Trametes sanguinea</i>	OP198490.1
4	488	488	99%	3e-133	98.56%	<i>Trametes sanguinea</i>	OP198489.1
5	488	488	99%	3e-133	98.56%	<i>Trametes sanguinea</i>	OP198488.1
6	488	488	99%	3e-133	98.56%	<i>Trametes sanguinea</i>	OP198485.1
7	488	488	99%	3e-133	98.56%	<i>Trametes sanguinea</i>	ON885559.1
8	488	488	99%	3e-133	98.56%	<i>Pycnoporus sp.</i>	KJ1654413.1
9	488	488	99%	3e-133	98.56%	<i>Trametes sanguinea</i>	MZ305070.1
10	488	488	99%	3e-133	98.56%	<i>Trametes sanguinea</i>	JN164982.1

Secuencias obtenidas y usadas en los análisis de manera interna del laboratorio

>CONTING_PS

TTCCGTAGGTGTACCTGCGGAAGGATCATTAAACGAGTTCTGAAAGGGGTTGTAGCTGGCCTTCCGGGGCA
 TGTGCACACCCTGCTCATCCACTCTACACCTGTGCACTTACTGTAGGTTTGGCGTGGGCTTCGGGGCCTC
 CGGGCTCTGAGGCATTCTGCCGGCCTATGTATCACTACAAACACATAAAGTAACAGAATGTATTTCGCGTC
 TAACGCATCTAAATACAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAAAAACGCAGCA

4.5. Análisis fisicoquímicos durante el proceso de Biodegradación.

Cual indica en la Figura 7, se representaron gráficamente los datos que mostraron tales resultados de pH obtenidos anteriormente y posteriormente del proceso de biorremediación. Los datos reflejaron proporcionar el comportamiento del pH en dos especies, *Pleurotus ostreatus* y *Pycnoporus sanguineus*, a lo largo de un periodo de 21 días. Inicialmente, ambos comenzaron con un pH de 6.25. Para *P. ostreatus*, el pH mostró un aumento gradual, alcanzando un pH de 6.79 al día 21. Por otro lado, *P. sanguineus* también mostró un incremento en el pH, pero de manera más pronunciada, alcanzando un pH de 7.76 al mismo día

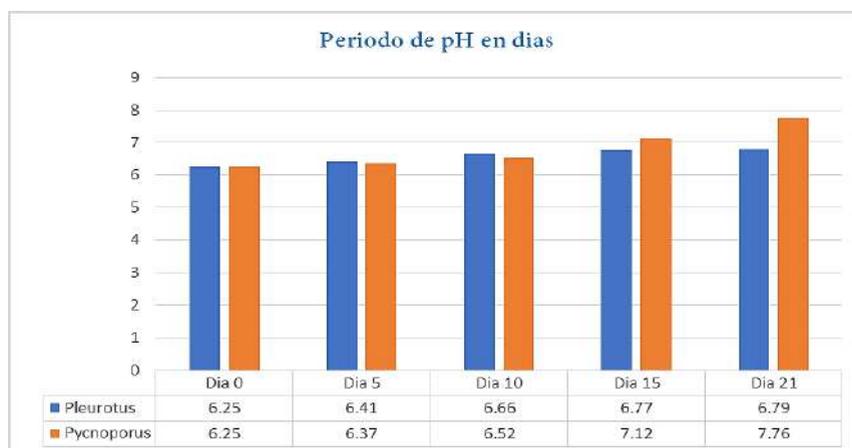


Figura 7. Resultados de Periodo de pH en días en *P. ostreatus* y *P. sanguineus*.

Los resultados de los parámetros de humedad y temperatura evaluados en *Pleurotus ostreatus* y *Pycnoporus sanguineus* se presentan en las figuras correspondientes. En cuanto al periodo de humedad (Figura 8), ambos hongos comenzaron con un 38% de humedad el día 0. Para *Pleurotus*, la humedad aumentó gradualmente hasta alcanzar el 58% el día 21, mientras que *Pycnoporus* mostró un incremento más pronunciado, llegando al 60% en el mismo día. En términos de temperatura (Figura 9), se observó un aumento similar para ambas especies. *Pleurotus* inició con 26.8°C y finalizó con 27.6°C, mientras que *Pycnoporus* comenzó con 26.9°C y alcanzó 28.1°C al día 21. Estos resultados reflejan una tendencia al alza tanto en humedad como en temperatura durante el periodo de estudio para ambas especies, indicando una adaptación a las condiciones ambientales a lo largo del tiempo.

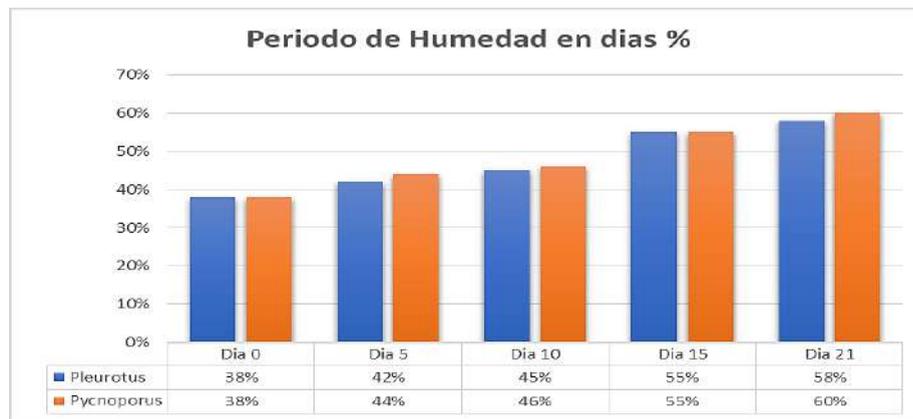


Figura 8. Resultados del Periodo de Humedad en días %.

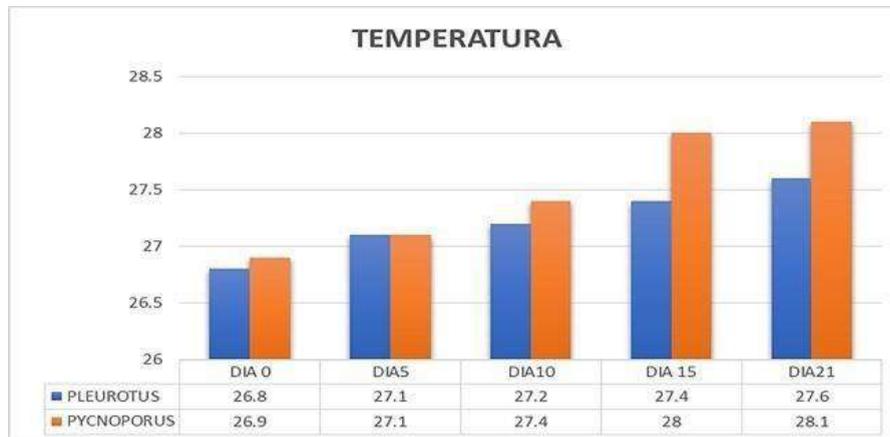


Figura 9. Resultados de Periodo de temperatura en días.

4.6 Estimación de biomasa del micelio de *Pleurotus ostreatus* y *Pycnoporus sanguineus*

En los sistemas de inoculación de las cepas, entre las semanas dos y tres, el crecimiento de los cultivos alcanzó 1258 m/g para *Pleurotus* y 890 m/g para *Pycnoporus* (Figura 10). Se observó un mayor crecimiento de micelio en *Pleurotus*. No se evaluó el crecimiento durante las primeras semanas, ya que la proliferación del micelio era muy pobre en ese período.

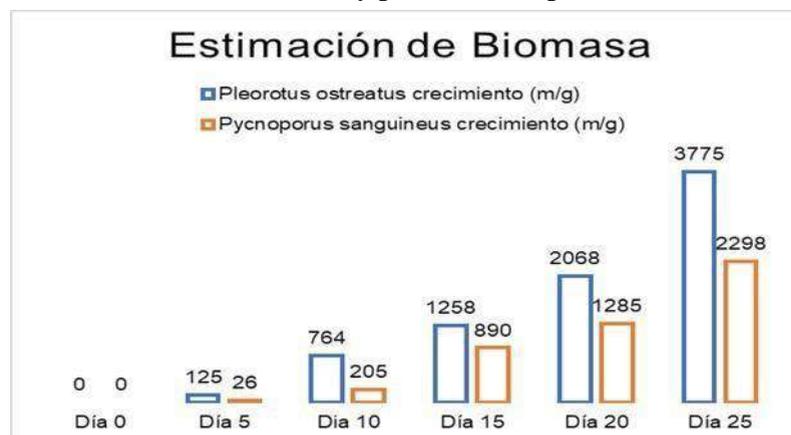


Figura 10. Crecimiento del micelio en suelos contaminados con hidrocarburo.

4.7 Degradación de hidrocarburos totales (HT)

4.7.1 Biodegradación de HT

Se estimó la evaluación de la capacidad de biodegradación de hidrocarburos por las especies de hongos *Pleurotus* y *Pycnoporus*, exponiéndolos a un sustrato contaminado durante 21 días (Figura 11). Se encontró que *Pleurotus* demostró una tasa de biodegradación significativamente superior (98,99% de los hidrocarburos degradados) en comparación con *Pycnoporus* (79,14%). Ambas especies mostraron capacidad para degradar hidrocarburos, destacando *Pleurotus* por su mayor eficiencia en el proceso biodegradativo.



Figura 11. Resultado de Biodegradación hidrocarburo en suelo contaminado.

4.7.2 Cuantificación de Hidrocarburos Totales por Cromatografía de gases

Se utilizó el método TPH Fracción 1 (C6-C10) según EPA METHOD 8015 Rev.03.2007 para extraer y cuantificar los TPH en muestras de suelo contaminado. Inicialmente, se preparó anhídrido sulfato de sodio pesando 10g y secándolo a 400 °C en una mufla por 4 hr. Luego, se mezclaron 10g de sulfato de sodio anhídrico seco con 10g de muestra de suelo y se colocaron en un extractor Soxhlet. Se añadieron relativamente 300ml de C₆H₁₄ en un matraz de 500ml conectado al extractor Soxhlet, calentándolo a 69-70 °C (temperatura de ebullición del hexano) durante 24 horas para la extracción. Después del proceso, el extracto se concentró usando una rota vapora unos 70 °C hasta que el volumen se redujo a 2-3ml. La muestra concentrada se transfirió a un vial de 2ml con tapa revestida de PTFE, se almacenó refrigerada y se cuantificó mediante cromatografía de gas.

para concluir la concentración de TPH en las muestras de suelo. Al determinar el porcentaje de degradación, se encontró que los tratamientos con *Pleurotus ostreatus* lograron una remoción del 74.55%, mientras que los tratamientos con *Pycnoporus sanguineus* alcanzaron el 60.26% (Figura 12).

Estos resultados destacan la efectividad de los métodos y procedimientos empleados.



Figura 12. Porcentaje por cromatografía de gases THP Final.

Se evaluó la capacidad de biodegradación de hidrocarburos por *Pleurotus ostreatus* y *Pycnoporus sanguineus* en un sustrato contaminado durante 21 días. Durante el tratamiento, se registraron cambios significativos en varios parámetros ambientales: el pH del sustrato aumentó de 6.25 a 6.79 y de 6.25 a 7.66 respectivamente. El contenido de carbono total se incrementó de 2.85 g/kg a 4.16 g/kg con *P. ostreatus* y a 4.65 g/kg con *P. sanguineus*. En cuanto al nitrógeno total, se observó un aumento de 2454.11 mg/kg a 2827.9 mg/kg con el primero y una disminución a 1785.5 mg/kg con el segundo. Además, el fósforo disponible aumentó de 11.34 mg/kg a 31.99 mg/kg con *Pleurotus ostreatus* y a 34.67 mg/kg con *P. sanguineus*. Respecto a la biodegradación de hidrocarburos totales, *P. ostreatus* logró una remoción del 74.34%, reduciendo los hidrocarburos de 115.17 mg/kg a 29.3 mg/kg, mientras que *P. sanguineus* alcanzó una remoción del 60.13%, reduciéndolos de 115.17 mg/kg a 45.76 mg/kg. La temperatura del sustrato se mantuvo estable entre 26.8°C y 27.6°C para *P. ostreatus*, y entre 26.9°C y 28.4°C para *P. sanguineus* (Tabla 8).

Tabla 8. Caracterización de parámetros evaluados por *Pleurotus ostreatus* y *Pycnoporus sanguineus*.

	<i>Pleurotus ostreatus</i>					<i>Pycnoporus sanguineus</i>				
pH	6.25	6.41	6.66	6.73	6.79	6.25	6.37	6.51	7.12	7.66
Carbono total	2.85	3.64	4.22	4.18	4.16	2.85	3.08	3.65	4.02	4.65
Nitrogeno total	2454.11	2697.21	2940.27	2856.42	2827.9	2454.11	2089.05	1425.5	1528.83	1785.5
Fósforo disponible	11.34	19.67	26.98	29.8	31.99	11.34	14.24	16.87	22.68	34.67
Hidrocarburos totales	115.17	95.16	60.77	42.18	29.3	115.17	105.46	98.99	79.14	45.76
Temperatura	26.8	27.1	27.2	27.4	27.6	26.9	27.1	27.4	28	28.4

4.8 Contraste de Hipótesis estadísticas

a. Hipótesis del investigador:

Determinar cuál de los dos tratamientos *Pleurotus ostreatus* y *Pycnoporus sanguineus* tendrá mayor porcentaje de biorremediación en suelos contaminados.

b. Redacción de la hipótesis:

H₀: Los tratamientos empleados no influyen efectivamente con los niveles de hidrocarburo (mg/Kg)

H₁: Los tratamientos empleados si influyen efectivamente con los niveles de hidrocarburo (mg/Kg)

c. Nivel de significancia

Definimos el porcentaje de error: $\alpha = 0,05 = 5\%$

d. Elección de la prueba estadística

Análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey.

e. Lectura de P-valor

Normalidad:

Se realiza la prueba de normalidad de Shapiro Wilk para muestras pequeñas menores de 30.

Tomándose los siguientes criterios para su determinación:

P-valor $\geq 0,05$ aceptamos H₀ = Los datos provienen de una distribución normal

P-valor $< 0,05$ Aceptamos H₁ = los datos no provienen de una distribución normal

Tabla 9. Tratamientos empleados para la prueba de normalidad de los niveles de hidrocarburo (mg/Kg).

	Tratamientos	Pruebas de normalidad					
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Nivel_de_hidrocarburos_totales	Testigo 1	.	5	.	.	5	.
	Testigo 2	.	5	.	.	5	.
	<i>Pleurotus</i>	,185	5	,200*	,943	5	,684
	<i>Pycnoporus</i>	,243	5	,200*	,911	5	,476

Como p-valor $0,684 \geq \alpha$ y p-valor $0,476 \geq \alpha$, donde $\alpha = 0,05$. Se acepta la hipótesis nula donde los datos de mortalidad provienen de una distribución normal.

- Homogeneidad de varianza

Se usa la prueba de Levene, considerando:

P-valor $\geq 0,05$ aceptamos H_0 = La varianza de los grupos son homogéneas

P-valor $< 0,05$ Aceptamos H_1 = La varianza de los grupos no son homogéneas

Tabla 10. Prueba de homogeneidad de varianza de los tratamientos empleados para los niveles de hidrocarburo(mg/Kg).

		Prueba de homogeneidad de varianza			
		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Nivel_de_hidrocarburos_totales	Se basa en la media	10,750	3	16	,062
	Se basa en la mediana	4,718	3	16	,015
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	4,718	3	7,996	,035
	Se basa en la media recortada	10,230	3	16	,010

Como p-valor $0,062 \geq \alpha$, donde $\alpha = 0,05$. Se acepta la hipótesis nula donde la varianza de los grupos es homogénea

f. Decisión estadística

Análisis por el análisis de varianza (ANOVA)

Tabla 11. Resumen del ANOVA de los tratamientos empleados para los niveles de hidrocarburo (mg/Kg).

ANOVA					
Nivel_de_hidrocarburos_totales	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	7685,834	3	2561,945	4,999	,012
Dentro de grupos	8200,450	16	512,528		
Total	15886,285	19			

Tabla 12. Comparaciones múltiples de Tukey de los tratamientos empleados para los niveles de hidrocarburo (mg/Kg).

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Nivel_de_hidrocarburos_totales

HSD Tukey

(I) Tratamientos	(J) Tratamientos	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Testigo 1	Testigo 2	,00000	14,31821	1,000	-40,9647	40,9647
	<i>Pleurotus</i>	46,65400*	14,31821	,023	5,6893	87,6187
	<i>Pycnoporus</i>	26,26600	14,31821	,294	-14,6987	67,2307
Testigo 2	Testigo 1	,00000	14,31821	1,000	-40,9647	40,9647
	<i>Pleurotus</i>	46,65400*	14,31821	,023	5,6893	87,6187
	<i>Pycnoporus</i>	26,26600	14,31821	,294	-14,6987	67,2307
<i>Pleurotus</i>	Testigo 1	-46,65400*	14,31821	,023	-87,6187	-5,6893
	Testigo 2	-46,65400*	14,31821	,023	-87,6187	-5,6893
	<i>Pycnoporus</i>	-20,38800	14,31821	,503	-61,3527	20,5767
<i>Pycnoporus</i>	Testigo 1	-26,26600	14,31821	,294	-67,2307	14,6987
	Testigo 2	-26,26600	14,31821	,294	-67,2307	
	<i>Pleurotus</i>	20,38800	14,31821	,503	-20,5767	61,3527

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

g. Conclusiones.

En el Análisis de Varianza, se observa que el nivel de significancia (p-valor) calculado de 0,012 es mayor que el valor α de 0,05, lo que indica que los datos observados son estadísticamente significativos. Por lo tanto, se acepta la hipótesis alterna, lo que sugiere que hay una diferencia significativa entre los tratamientos empleados para los niveles de hidrocarburos (mg/Kg). La prueba de comparación múltiple de Tukey también muestra que los niveles de significancia inferiores a $\alpha = 0,05$ indican que los datos observados son estadísticamente significativos. Así, la comparación entre los testigos 1 y 2 evidencia una diferencia significativa con los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Pycnoporus sanguineus* en relación con los niveles de hidrocarburos (mg/Kg). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre ambos hongos.

Capítulo V. Discusión

5.1 Discusión de resultados

La distribución de los macrohongos de podredumbre blanca en el Perú se encuentra mayormente en la selva, donde existe una amplia variedad de especies en condiciones provechosos para su desarrollo como el pH, humedad y temperatura que mantiene dicha zona geográfica (ver fig. 4), tal como lo menciona Ruiz (2016) en su investigación, sustentando que los macrohongos de la clase Ascomycota y Basidiomycota son los principales descomponedores del abundante material orgánico hasta su mineralización, siendo un factor clave para la dinámica del ecosistema; se pudo localizar y reconocer las especies objetivo de este estudio: *Pleurotus ostreatus* y *Pycnoporus sanguineus* (ver anexo); así mismo, dicha zona es un punto afectado por el derramamiento de petróleo crudo, ocasionando problemas a la superficie fértil y por ende, a la flora de dicha localidad, se extrajo las muestras, se almacenaron y se trasladó al laboratorio.

Siguiendo un riguroso procedimiento de aislamiento se pudo obtener cepas viables para el estudio, pudiendo realizar una caracterización de las especies objetivo, las técnicas moleculares empleadas son específicas para identificar las regiones de ADN del organismo (ver figura 6 y tabla 07), que tal como menciona Cevallos y García (2018), el desarrollo de *Pleurotus* en condiciones in vitro lo obtuvo en 10 días pudiendo apreciar un micelio de color blanca algodonosa de 0.6mm de altitud formando anillos en el centro del medio de cultivo, segregando una sustancia amarilla una vez maduro. También realizó una identificación molecular extrayendo el ADN, empleando una electroforesis con gel de agarosa y pudiendo analizar las secuencias amplificadas con el programa BLAST obteniendo un porcentaje de identidad del 100% logrando corroborar que se trataba de *Pleurotus ostreatus*, caso similar, con nuestra identificación molecular mediante DNA barcoding pudiendo identificar el material genético propio mediante marcadores moleculares.

Ruiz (2018), logró repicar sus organismos pudiendo obtener cepas puras en 15 días para *Pleurotus ostreatus* y *Pycnoporus sanguineus*, identificando macroscópicamente con las características distintivas

como el tipo de desarrollo, la textura, color o la presencia/ausencia de micelio aéreo; lo cual afirma el desarrollo de hongos obtenido y tal como se observa en la **tabla 06**, el crecimiento fue asertivo.

Las propiedades favorables para el desarrollo y crecimiento de los basidiomicetos, se deben al pH, humedad y temperatura que fueron medidos durante los 21 días de tratamiento, los valores fueron en creciente tal como se observa en las figuras 7,8 y 9; esto es debido a la actividad metabólica de los hongos, puesto que al tener los nutrientes necesarios para su desarrollo asimiló favorablemente el hidrocarburo presente en el suelo, es por ello el incremento de los patrones fisicoquímicos y de la estimación de biomasa; teniendo mayor crecimiento durante los días 15 en adelante (ver figura 10), que tal como menciona Cevallos y García (2018) la temperatura y humedad influye en la biodegradación de TPH's y HAP's durante la adaptación del sustrato y crecimiento del organismo; así mismo, señala que los análisis fisicoquímicos obtenidos con un consorcio de *Aspergillus niger* + *Pleurotus ostreatus* fueron en promedio de: 7,2 en pH, 16,57° en temperatura y 56,80% en humedad, favoreciendo la degradación de hidrocarburos presentes en el suelo, al transformar el hidrocarburo en cadenas más simples y menos tóxicos verificando la recuperación del suelo afectado al reducir de 104,23 a 93,38mg/kg con una eficiencia de remoción de 10%. Sustentando que el consorcio empleado con los hongos *Aspergillus niger* y *Pleurotus ostreatus* se alimentan principalmente de materia orgánica y al entrar en contacto con anillos de benceno estimulan enzimas tales como las manganasas, lipasas, fenoloxidasas y lacasas rompiendo los anillos y asimilando el contaminante.

El Proyecto de investigación se utilizó como fuente de alimento para el crecimiento de los micelios de cada especie bagazo de caña ya que es una fuente de crecimiento muy rápido donde los hongos producirán su micelio porque descompondrán la lignina según Vidali (2001), hace saber que el uso de los hongos tiene la capacidad de propagación micelial hacen que sean candidatos número 1 para ser aplicados en la biorremediación su capacidad de degradar hidrocarburos de cualquier tipo pesado y extra pesado ha sido muy escasa estudiado en el mundo. Los índices de hidrocarburo administrado a los tratamientos fue reduciendo con el pasar de los días (ver figura 11), según Castro & Rivillas (2012) en sus trabajos

realizados con *Pycnoporus sp* y *Pleurotus ostreatus* indican que son hongos con características de alta reproducción a diferentes climas , ya que eligen al hidrocarburo como fuente de alimento(C) para su desarrollo y debido rapidez de esporulación permite una propagacion más acelerada en suelos contaminados con hidrocarburos , con ello se puede comprobar la actividad degradativa siendo en *Pleurotus ostreatus* mucho más activa obteniendo mayor eficiencia al reducir de 115,27mg/kg a 29,3mg/kg con una eficiencia de remoción del 74,55% de hidrocarburos totales, en cambio, *Pycnoporus sanguineus* logró reducir 115,27mg/kg a 45.76mg/kg con una eficiencia de remoción de 60,26% durante los últimos días(ver figura 12); se comparte con Zegarra (2017) sobre la utilización de *Pleurotus ostreatus* en suelos contaminados con Pb donde consiguió como resultado una eficiencia de 29,4% con 792,00 mg/kg de suelo contaminado con relave minero y suplementado con aserrín, comparto también con Rodríguez, (2018) donde aísla la especie *Pycnoporus sanguineus* para ser utilizado en la remoción de iones de Pb (II) y Cu (II), comparto con Sifuentes (2014) para el crecimiento de la biomasa que utilizo la suspensión de trigo y cebada con micelio se logró observar en que las colonizaciones micelar en el suelo contaminado llego a alcanzar un 2,23cm donde las condiciones óptimas fueron el pH del suelo donde se estuvo midiendo cada 8 días. Gacura (2009), utiliza microscopia de fluorescencia, para la estimación la biomasa de *P. ostreatus* en sedimentos de río usando como suplementos aserrín, dos niveles de N y B-ciclodextrina, donde a la semana dos de incubación la biomasa tuvo un alcance de niveles entre $49,85 \pm 12,13$ m/g de sedimento, con el procedimiento con aserrín de alto contenido de nitrógeno y $114,48 \pm 37,58$ m/g de sedimento, con el tratamiento con aserrín y ciclo dextrina, Hu (2002) refiere que también los metales pesados al igual que los hidrocarburos de masa atómica elevada por lo general son notables, su difusión , su tendencia de poder acoger en algunos tejidos del cuerpo y su potencial de ser toxico a un nivel de exposición definitivamente bajo.

Con los resultados obtenidos se puede corroborar la capacidad degradativa de los hongos lo cual favorece a la biodegradación de suelos contaminados por compuestos xenobióticos, al reducir los valores de HTP y aumentar en moléculas de N y F como es el caso de *P.ostreatus* ,mientras que *P. sanguineus* aumentó los valores de F disponible (ver tabla 8) estos elementos son importantes para la recuperación del suelo. Esto corrobora lo mencionado por Cárdenas (2018) quien obtuvo una degradación de 5% del

hidrocarburo inicial con hongos de pobredumbre blanca (*Phanerochaete chrysosporium* y *Pycnoporus cinnabarinus*) sin inmovilizar mientras que con un sistema inmovilizado tuvieron 62 y 72%, justifica que la acción degradativa se relaciona con la actividad enzimática, pues para *P. chrysosporium* la enzima MnP, es la encargada de degradación de contaminantes y por otro lado, para *P. cinnabarinus* la enzima Lac, es el agente de la degradación seguida de MnP y LiP. Además, afirma que los parámetros como la capacidad de retención y la humedad del suelo, indican que el nivel de agua en el sistema es correcto para una actividad microbiana adecuada durante los ensayos de degradación. La cantidad de agua que se necesita para tener un % de 60 de humedad en el sistema se puede calcular con la capacidad de retención.

En la presente investigación se buscó remediar el suelo contaminados de hidrocarburo, por esto logro de determinar la eficiencia de la biodegradación en los dos grupos de tratamiento trabajado donde los resultados fueron efectivos de la eficiencia de remoción de *Pleurotus ostreatus* llego a un 74.55% y en *Pycnoporus sanguineus* un 60.26%, durante los días finales ,comparto con “Zegarra, 2017.” el uso de *Pleurotus Ostreatus* en suelos contaminados donde su trabajo con Pb donde consiguió como resultado una eficiencia de 29.4% con 792,00 mg/kg de suelo contaminado con relave minero y suplementado con aserrín, comparto también con (Rodríguez, 2018) *Pycnoporus sanguineus* donde aísla la especie para ser utilizado en la remoción de iones de Pb (II) y Cu (II), comparto con (Sifuentes, 2014) para el crecimiento de la biomasa que utilizo la suspensión de trigo y cebada con micelio se logró observar en que las colonizaciones micelar en el suelo contaminado llego a alcanzar un 2.23cm donde las condiciones óptimas fueron el pH del suelo donde se estuvo midiendo cada 8 días.

El Proyecto de investigación se utilizó como fuente de alimento para el crecimiento de los micelios de cada especie bagazo de caña ya que es una fuente de crecimiento muy rápido donde los hongos producirán su micelio porque descompondrán la lignina según Vidali, (2001) hace saber que el uso de los hongos tiene la capacidad de propagación micelial hacen que sean candidatos número 1 para ser aplicados en la biorremediación su capacidad de degradar hidrocarburos de cualquier tipo pesado y extra pesado ha sido muy escasa estudiado en el mundo. Según Castro & Rivillas, (2012) indican que en sus trabajos realizados con *Pycnoporus* spp y *Pleurotus ostreatus* son hongos con ciertas características de alto

reproducción a diferentes ambientes, ya que eligen al hidrocarburo como fuente de alimento (carbono) para su crecimiento, ya que gracias a su alta esporulación permite una reproducción rápida en suelos contaminados con hidrocarburos totales de petróleo.

Capítulo VI. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

- Con los resultados obtenidos se concluye que los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Pycnoporus sanguineus* lograron la biodegradación del suelo contaminado en una reducción satisfactoria en un periodo de 21 días ya que las condiciones fueron optimas en los estudios trabajados.
- Se logró determinar la eficiencia de la biodegradación destacando en un porcentaje 60.26% en corto plazo de 21 días con efectividad del uso del hongo *Pleurotus ostreatus* logro la biodegradación del hidrocarburo suelo contaminado.
- Se logró determinar la eficiencia de la biodegradación destacando en un porcentaje 74.25% en corto plazo de 21 días ya que el uso del hongo *Pycnoporus sanguineus* logro la biodegradación del hidrocarburo suelo contaminado, lo cual el suelo tratado puede ser utilizado para fines ecológicos.

6.2 Recomendaciones

- Para una investigación más compleja añadir o incluir ensayos cinéticos con otros microorganismos con el fin de desarrollar un método más rápido.
- En base a los costos se puede utilizar el *Pleurotus ostreatus* y *Pycnoporus sanguineus* para una amplia investigación ya que son de fácil acceso a su manejo.
- Se puede utilizar estudios comparativos con otras especies de hongos, para poder determinar la eficiencia y sus grados de biorremediación.
- Habiendo evaluado la eficiencia de la biodegradación con sustrato de bagazo se debería aplicar el tratamiento a gran escala en sitios de condiciones ambientales no controladas.

Referencias

- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology*. EE: Elsevier Academic Press.
- Analiz, L. (2016). Analiz, L. (2016). “Eficiencia de Remoción de cuatro fungi de pudrición blanca en medios acuosos inducidos con Cobre y Zinc”. Tingo María, Perú: Universidad Nacional Agraria de la Selva.
- Andrade, R., Mata, J., & Sánchez, E. (2012). “La producción Iberoamericana de hongos comestibles en el contexto internacional, Hongos comestibles y medicinales de Iberoamérica”. *Investigación y desarrollo en un entorno multicultural*.
- Banwari, L., Jyot, J., Kuhad, R., & Mishra, S. (2001). Evaluation of Inoculum Addition To Stimulate In Situ Bioremediation of Oily-Sludge Contaminated Soil. *67: 1675-1681: Microbiol. Biotechnol.*
- Barcelos, R., Flores, A., Mendonça, M., & Soares, I. (2011). Fungos na biorremediação de áreas degradadas. *Arquivos do Instituto Biológico*.
- Bedoya, C., & Hernando, E. (2018). “Evaluación in vitro de la capacidad biorremediadora de hongos filamentosos sobre petróleo crudo”. (Vol. 16). NOVA.
- Berger, T. (2005). Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos totais de petróleo – enfoque na aplicação do processo de Terraferm. Doctor. . Porto Alegre – Brazil.: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Blanco, M., González, A., & Martín, C. (2004). “Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos”. *Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. Rev Iberoam Micol.*
- Boukhris, E., Gimberti, A., & Lomascolo, A. (2011). Peculiarities of *Pycnoporus* species for applications in biotechnology. *Microbiol Biotechnol.*
- Bruns, T., & Gardes, M. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes- application to the identification of mycorrhizae and rusts (Vol. 2). *Molecular Ecology*.
- Bustillo, Á. (2010). Método para cuantificar suspensiones de esporas de hongos y otros organismos.

- Carlos, J. (2015). "Bioremediation of contaminated soils with polycyclic aromatic hydrocarbons using mushroom substrate (*Agaricus bisporus*)". Madrid: Universidad Nacional de Madrid.
- Castro, A., & Rivillas, C. (2012). "Pycnoporus ssp *Pleurotus ostreatus*. Modos de acción, eficacia y usos en el cultivo de café". Chinchina, Caldas, Colombia.
- Cázares, E., Garza, F., & Guevara, G. (2004). "Estudio del ITS nuclear en algunas especies del género *Cantharellus* de México" (Vol. 3). Ciencia UANL.
- Cevallos, T., & García, J. (2018). "Evaluación de la Biodegradación de suelos contaminados con hidrocarburos utilizando *Aspergillus niger*, *Pleurotus ostreatus* y *Pseudomonas aeruginosa*". Universidad Politécnica Salesiana. Obtenido de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/15681/1/UPS-QT12819.pdf>
- Cimmyt. (2013). Contenido de humedad del suelo. Obtenido de Guía útil para comparar las prácticas de manejo de cultivo: <https://repository.cimmyt.org/bitstream/handle/10883/4030/98829.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Coffey, M., Di Bonito, M., Dickson, U. J., George, R., & Ray, N. (2019). Mycoremediation of petroleum contaminated soils: progress, prospects and perspectives. Obtenido de Royal Society of Chemistry: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2019/em/c9em00101h/unauth#!divAbstract>
- Conklin, D., & Desjardins, P. (2010). NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids.
- Córdova, H. (2010). "Desinfección y cultivo de *Auricularia auricula* y *Auricularia delicata* a partir de *Basicarpo* y *Basidiosporas*". Tingo María, Perú.
- Du, L., Gao, D., Liang, H., Wu, W., & Yang, J. (2010). A critical review of the application of white rot fungus to environmental pollution control. *Critical Reviews in Biotechnology*.
- Escalante, E. (2000). "Estudio de Ecotoxicidad de un suelo contaminado con hidrocarburos". Ciudad de México: Universidad Autónoma Metropolitana de México. Obtenido de

http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/2290/Buend%C3%ADa_rh.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Fletcher, T. (2002). Contamination, evacuation and resettlement, Land use Policy.

doi:10.1016/S0264- 8377(02)00045-5

Floriani, F. (2009). Biodegradação de 2,4-diclorofenol e 2,4,6-triclorofenol por fungos do gênero Pleurotus. . Brasil.

Frazar, C. (2000). “The Bioremediation and Phytoremediation of Pesticide – contaminated Sites”. Prepared for U.S Environmental protection Agency. Washington, DC: Office of Solid Waste and Emergency Response, Technology Innovation Office.

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

Gadd, G. (2001). Fungi in Bioremediation. . Cambridge University Press , Estados Unidos.

García, F., Medina, J., & Paracaguán, B. (2014). “Biodegradación de petróleo por microorganismos autóctonos en suelos contaminados provenientes de la bahía de Amuay del Estado Falcón”. Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela: Ingeniería UC. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/707/70732642007.pdf>

Garzón, J., Hernández, C., & Rodríguez, J. (2017). “Aporte de la biorremediación para solucionar problemas de contaminación y su relación con el desarrollo sostenible”. doi:<http://dx.doi.org/10.22267/rus.171902.93>

Glosbe. (2021). Suspensión Biológica. Obtenido de <https://es.glosbe.com/es/es/suspensi%C3%B3n%20biol%C3%B3gica>

Gonzales, J. (2017). “Técnicas para mejorar el transporte de crudos pesados por oleoductos”. Quito, Ecuador. Obtenido de <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/18837/1/CD- 8227.pdf>

Goyenola, G. (2018). Determinación de pH. Instituto Chaikuni, Montevideo, Uruguay. Obtenido de <https://chaikuni.org/wp-content/uploads/2018/10/La-Serpiente-Negra-De-La->

Herrera, T., & Ulloa, M. (1990). El reino de los hongos. México: Micología básica y aplicada.

Ciudad e México.

Higgins, J. (2012). PCR amplification of Fungal ITS1 and/or ITS2 rDNA gene regions.

Hu, H. (2002). Life Support: The Environment and Human Health. Human Health and Heavy Metals 2002. págs. 65-81. Exposure.

Juárez, D. (2014). "Estudio del efecto del pH en la biodegradación de hidrocarburos en suelo".

Universidad Autónoma Metropolitana, Azcapotzalco, México.

Leahy, J., & Colwell, R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment.

Microbiol, Rev 54. Obtenido de Leahy, J., & Colwell, R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons <https://derramespetroleros.pe/wp-content/uploads/2020/10/18536-Sombra-de-los-hidrocarburos-web.pdf>

León, A., & Zuñiga, M. (2022). La sombra de los hidrocarburos en el Perú. OFXAM. Obtenido de <https://peru.oxfam.org/lo-%C3%BAltimo/publicaciones/la-sombra-de-los-hidrocarburos-en-el-peru>.

LI Changfeng, KEHAI Zhou, WENQIANG Qin, Changjiu Tian, Miao Qi, Xiaoming Yan & Wenbing Han (2019): A Review on Heavy Metals Contamination in Soil: Effects, Sources, and Remediation Techniques, Soil and Sediment Contamination: An International Journal, DOI: 10.1080/15320383.2019.1592108.

Magueda, A. (2003). Fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados.

Universidad de las Américas, Puebla, México.

Manta, M., Orellana, G., & Torres, C. (2014). Prospección y evaluación de síntomas y signos de enfermedades en especies forestales. Ica, Perú: XXIII Congreso Peruano de Fitopatología.

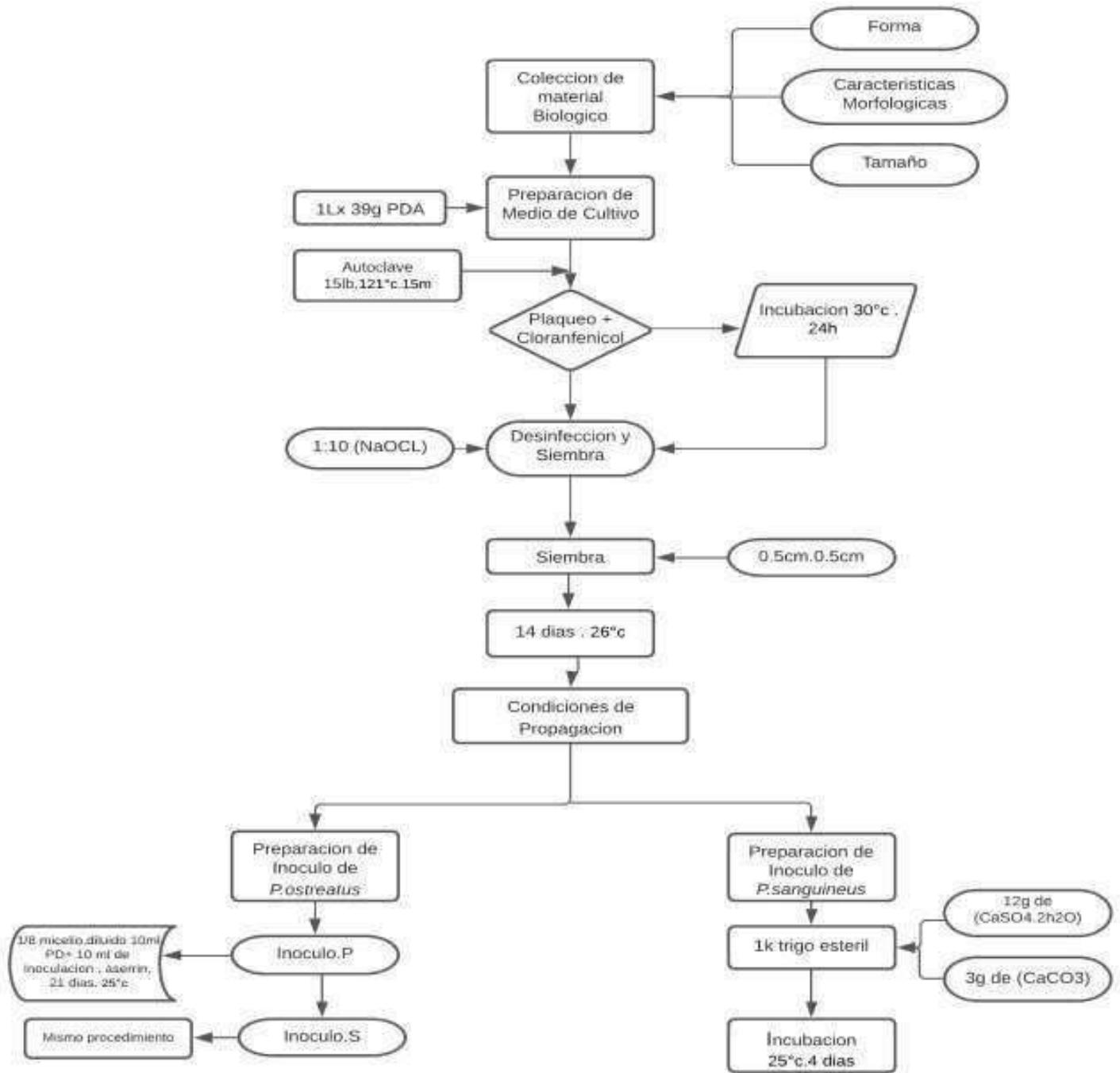
Marcovecchio, J., & Moreno, V. (1991). Metal accumulation in tissues of sharks from the Bahía Blanca Estuary, Argentina. Marine Environment Research.

Martínez, O., Pinochet, D., Solís, L., & Valenzuela, E. (2006). Hongos aislados desde suelos contaminados con petróleo (Vol. 21). Chile: Boletín Micológico.

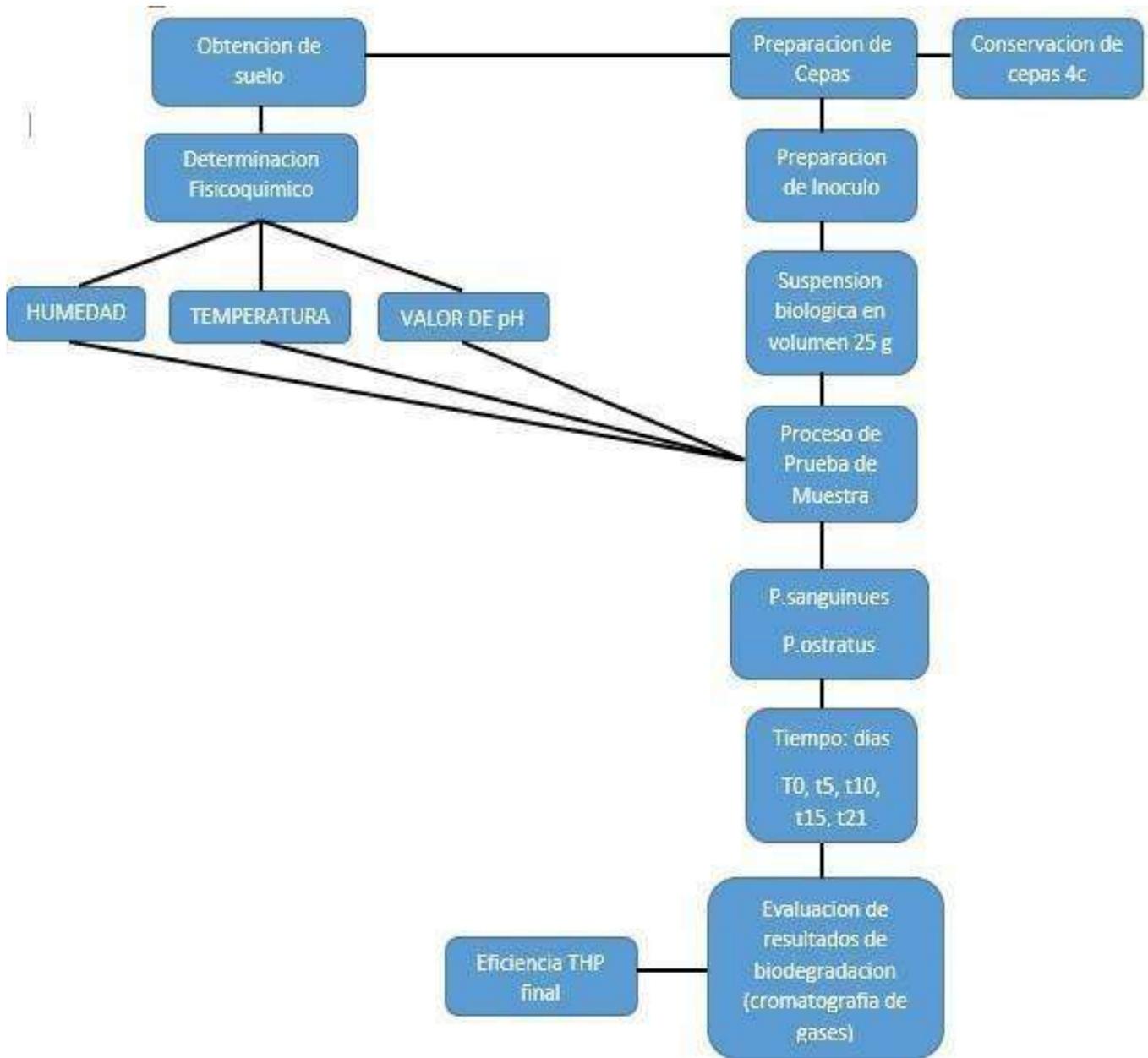
- MINAM. (2013). D.S N 002-2013. Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para suelos.
- Mulatillo, M. (2019). Derrame de petróleo en el distrito de Manseriche, Loreto. Loreto, Perú: Informede Emergencia. Obtenido de <https://www.indeci.gob.pe/wp-content/uploads/2019/06/INFORME-DE-EMERGENCIA-N%C2%BA-592-29JUN2019-DERRAME-DE-PETR%C3%93LEO-E>
- NOVA. (2006). Manual de buenas prácticas de manufactura para la preservación de madera aserrada; acorde a los estándares expresados en las propuestas de normas. Lima, Perú: Dirección Nacional de Desarrollo de Comercio Exterior.
- Olivera Campos, A. (2020). “ASPERGILLUS Y ACINETOBACTER Sp Para la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos”. Chiclayo, Perú.
- OKOH, E., YELEBE, Z. R., ORUABENA, B., Nelson, E. S., & Indiamawei, O. P. (2019). Clean-up of crude oil-contaminated soils: bioremediation option. *International Journal of Environmental Science and Technology*. doi:10.1007/s13762-019-02605-y
- Planas, O. (2020). Temperatura. Obtenido de Energía solar: <https://solar-energia.net/definiciones/temperatura>
- Pointing, S. (2019). Feasibility of bioremediation by white rot fungi. (R. 2019, Editor) Obtenido de *Microbiol Biotechnol*: <https://dle.rae.es/temperatura?m=form>
- RAE. (2019). Temperatura. Obtenido de Real Academia Española: <https://dle.rae.es/temperature?m=form>
- Rodríguez, M. (2017). Removal of total hydrocarbons in soils contaminated with oil through waste of Cachaza and Bagazo of sugar cane.
- Rodríguez, M. (2018). Remoción de Plomo y Cobre en solución acuosa por *Pycnoporus sanguineus* en Biorreactores Air Lift. Universidad Agraria de la Selva, Tingo María, Perú.
- Ruíz, R. (1990). “Aislamiento y cultivo del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*”. Tingo María, Perú.
- Sharma, V., & Kumar, S. (2011). Spawn Production Technology. En: *Mushrooms Cultivation, Marketing and Consumption*. Directorate of Mushroom Research (ICAR),. India.

- Sifuentes, E. (2014). "Producción de inóculo de *Pleurotus ostreatus* para uso en biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo". Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú. doi:T01-S53-T.pdf.
- Singh, R. (2017). *Principles and Applications of Environmental Biotechnology for a Sustainable Future*. Springer, Singapur.
- Sullia, S. (2003). *Fungal Diversity and Bioremediation*.
- Torres, C. (2020). *Evaluación de enfermedades de planta*. Lima, Perú: SENASA.
- Velasco, J., & Volke, T. (2002). "Tecnologías de remediación para suelos contaminados". México D.F, México: Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT).
- Vidali. (2001). *Bioremediation of petroleum and Petroleum Products*. Atlas.
- White, T. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Zegarra, R. (2017). "Capacidad del hongo *Pleurotus ostratus* para la biorremediación de suelos contaminados con plomo (Pb) en el laboratorio". Perú.

Anexos



Anexo 1. Flujograma de bloques de procedimientos realizados trabajo 01.
Suspensión biológica de *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus sanguineus* para remediar suelos contaminado con hidrocarburo.



Anexo 2. Flujograma de bloques de procedimientos realizados trabajo 02.

Suspensión biológica de *Pleurotus ostreatus*, *Pycnoporus sanguineus* para remediar suelos contaminados con hidrocarburo.

INFORME N° 008-23	Fecha de realización: 27/12/2023
Cliente:	John Acuña Zanabria DNI: 77468828 zanabria020395@gmail.com 994-931-163
Servicio:	Servicio de identificación molecular de hongos por DNA barcoding
Cotización:	CBS-300-2023-JACUÑA-071123
Fecha de recepción:	10/11/2023
Boleta de venta:	B001-00000003

1. Detalle del servicio solicitado:

Servicio de identificación molecular de hongos por secuenciación de la región ITS.

2. Análisis de muestras:

Se recibió 02 muestra de cultivo de hongo, rotuladas como: *Pycnoporus sanguineus* Y *Pleurotus ostreatus*.

Anexo 3. Servicio de la Empresa BTS para el secuenciamiento DNA barcoding.

INFORME DE ENSAYO IE-2023-2272

1. **DATOS DEL CLIENTE**
 - 1.1 Cliente : JOHN ACUÑA ZANABRIA
 - 1.2 RUC o DNI : 77468828
 - 1.3 Dirección : No Precisa
2. **DATOS DE LA MUESTRA**
 - 2.1 Producto : SUELOS AGRÍCOLAS
 - 2.2 Muestreado por : CLIENTE ⁽¹⁾
 - 2.3 Número de Muestras : 01
 - 2.4 Fecha de Recepción : 2023-12-21
 - 2.5 Período de Ensayo : 2023-12-21 al 2023-12-28
 - 2.6 Fecha de Emisión : 2023-12-29
 - 2.7 Fecha y Hora de Muestreo : 2023-12-21 / 01:30 pm ⁽¹⁾
 - 2.8 N° de cotización : COT-137150-SL23

3. ENSAYO SOLICITADO - METODOLOGÍA UTILIZADA

ENSAYO	MÉTODO
Potencial de hidrógeno (pH)	Relación 1:2 Agua-Suelo (Potenciometría)
Nitrógeno Total	Digestión Kjeldahl
Fósforo Disponible (P)	Oliseñ modificado (UV Visible)
Carbono Orgánico Total	NOM-021-RECNAT-2000 AS-07, ítem 7.1.7
Hidrocarburos Totales de Petróleo Fracción 1 (C6 - C10)	EPA METHOD 8015C Rev. 03 2007. <i>Investigación</i> Nonhalogenated Organics by Gas Chromatography

4. RESULTADOS

4.1. RESULTADOS OBTENIDOS

Descripción de Muestra: SUELO CON PETRÓLEO (M.2)
HUACHO
780 gr de suelo contaminado + microorganismos
20 días de exposición 27°C ⁽¹⁾

Nombre del proyecto: "Eficiencia biológica para remediar suelos contaminado con hidrocarburo mediante Basidiomycetos *pleurotus ostreatus* y *pycnoporus sanguineus*" ⁽¹⁾



Anexo 4. Servicios prestados de la Empresa SLab, para los procesos de TPH. Informe de ensayos bioquímicos.

Tabla 13. Días de incubación y biomasa de tratamientos.

Días de Incubación	Control (m/g)	<i>Pleurotus ostreatus</i> crecimiento (m/g)	<i>Pycnoporus sanguineus</i> crecimiento (m/g)
Día 0	0	0	0
Día 5	0	125	26
Día 10	0	764	205
Día 15	0	1258	890
Día 20	0	2068	1285
Día 25	0	3775	2298

Biomasa de hongos y días de incubación.sav [ConjuntoDatos0] - IBM SPSS Statistics Editor de datos

Hongos	Crecimiento
1	0
2	125
3	764
4	1258
5	2068
6	3775
7	0
8	26
9	205
10	890
11	1285
12	2298
13	0
14	0
15	0
16	0
17	0
18	0

Tabla 14. Tratamientos empleados y niveles de hidrocarburos totales.

N° MUESTRAS	TIEMPO	Nivel de Hidrocarburos totales (mg/kg)			
		Testigo 1	Testigo 2	T1. <i>Pleurotus ostreatus</i>	T2. <i>Pycnoporus sanguineus</i>
M1	DIA 0	115	115	115.17	115
M2	DIA 5	115	115	95.16	105
M3	DIA 10	115	115	60.77	98
M4	DIA 15	115	115	42.18	79
M5	DIA 21	115	115	29.30	45

Tratamiento y niveles de hidrocarburos.sav [ConjuntoDatos2] - IBM SPSS Statistics Editor de datos

Tratamiento	Nivel de hidrocarburos totales
1	115.17
2	115.17
3	115.17
4	115.17
5	115.17
6	115.17
7	115.17
8	115.17
9	115.17
10	115.17
11	115.17
12	95.16
13	60.77
14	42.18
15	29.30
16	115.17
17	105.46
18	98.06
19	79.14
20	45.76

Anexo 5. Análisis de datos.

INFORME N° 008-23	Fecha de realización: 27/12/2023
CLIENTE :	John Acuña Zanabria DNI 77468828 zanabria020395@gmail.com 994-931-163
Servicio :	Barcoding: identificación molecular de hongo por DNA barcoding
Cotización:	CBS-300-2023-JACUÑA-071123
Fecha de recepción	10/11/2023
Boleta de venta:	8001-0000003

1. Detalle del servicio solicitado:

Servicio de identificación molecular de hongos por secuenciación de la región ITS.

2. Análisis de muestras:

Se recibió 02 muestra de cultivo de hongo, rotuladas como: *Pycnoporus sanguineus* y *Pleurotus ostreatus*.

3. Extracción del ADN de las muestras de cultivos de hongos:

Se utilizó un kit comercial de extracción (Presto™ Mini gDNA Yeast Kit, Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) para ADN hongos, de acuerdo con las indicaciones descritas en su manual. Cada pellet de hongos fue colocado en un microtubo de 1.5 ml y resuspendidos con 600 µl de GT Buffer, luego colocados con 5 µl de ARNasa A (50 mg/ml) en los tubos conteniendo los "beadbeating" (perlas de lisis), llevados a un vórtex con adaptador a máxima velocidad por 10 minutos. Luego se agregaron 100 µl de PR buffer, se mezclan y se incubaron

RUC: 2062842145

www.btsconsultores.pe

Nombre de primer	Secuencia 5'-3'primers
ITS1-F	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS2-R	GCTGCGTCTTCATCGATGC

Las secuencias resultantes fueron analizadas por el programa DNA Baser Assembler v5.08 (Heracle BioSoft, USA) y el servidor BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

5. Resultados del análisis de secuencias:

Todas las muestras fueron amplificadas y analizadas. Los reads alineados para cada primer (forward + reverse), 6 reads por cada muestra, dieron una secuencia consenso correcta por cada muestra.

Se comparó cada secuencia consenso con toda la base de datos de secuencias reportadas en el Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) utilizando el servidor BLAST, se seleccionó el mejor resultado, de acuerdo al mayor score E-value = 0 e identidad mayor a 99%. Considerando los organismos con nomenclatura binomial completa.

6. Resultado BLAST para las muestras:

Datos las 10 primeras especies putativas de acuerdo con su comparación BLAST con la base de datos del GenBank

#	Max score	Total score	Query cover	Evalue	Porcentaje de identidad	Especie putativa	N° de acceso
1	400	400	90%	3e-133	98.56%	<i>Trametes sanguinea</i>	MT504659.1
2	400	400	90%	3e-133	98.56%	<i>Trametes coccinea</i>	MF377427.1
3	400	400	90%	3e-133	98.56%	<i>Trametes sanguinea</i>	OP108400.1
4	400	400	90%	3e-133	98.56%	<i>Trametes sanguinea</i>	OP198489.1

RUC: 2062842145

www.btsconsultores.pe

en hielo por 5 minutos. Después de la incubación se centrifugaron a 11,000 x g por 3 minutos y se transfirió 450 µl del sobrenadante a un nuevo microtubo de 1.5 ml.

Al transferido se agregó 450 µl de G8 Buffer y 450 µl de etanol absoluto, se mezcló vigorosamente por 10 minutos. La mezcla se transfirió a las columnas GD con los tubos de colección, se centrifugó a 16,000 x g por 1 minuto, descartando el eluido y repitiendo el proceso con la mezcla restante sobre la misma columna; una vez descartado todo el eluido se agregaron 400 µl de W1 Buffer sobre la columna GD y se centrifugó a 16,000 x g por 30 segundos, se descartó el eluido y se agregaron 600 µl de Wash Buffer sobre la columna GD, se centrifugó a 16,000 x g por 30 segundos; se descarta el eluido y se centrifuga nuevamente a 16,000 x g por 3 minutos para secar la columna, en todos los pasos se reutiliza el tubo de colección.

Finalmente, se transfirió la columna GD a un microtubo de 1.5 ml nuevo, se agregó 100 µl de buffer de elución precalentado a 70° C y se dejó incubando por 3 minutos. Se centrifugó a 16,000 x g por 2 minutos y se guardó el ADN purificado hasta su posterior uso o conservación a -20°C.

4. Amplificación parcial de la región ITS (hongos):

Las amplificaciones fueron con los primers de la siguiente tabla:

Nombre de primer	Secuencia 5'-3'primers
ITS1-F	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4-R	TCTCCGCTTATTGATATGC

Las PCR se realizaron basadas en la literatura con algunas modificaciones de acuerdo los protocolos internos de nuestro laboratorio. Para la amplificación se usó la enzima PCR BIO HiFi Polymerase (PCR Biosystems Ltd., Reino Unido).

Los productos a amplificadas, fueron purificados con el GeneFlow Gel/PCR Kit (Geneaid, Taiwan), de acuerdo al protocolo del kit. Los productos de PCR purificados fueron enviados a secuenciar por tecnología SANGER a la empresa Bio Basic Inc. (Canadá). Se secuenció usando los primers:

RUC: 2062842145

www.btsconsultores.pe

5	400	400	90%	3e-133	98.56%	<i>Trametes sanguinea</i>	QJ108488.1
6	400	400	90%	3e-133	98.56%	<i>Trametes sanguinea</i>	QJ1196455.1
7	400	400	90%	3e-133	98.56%	<i>Trametes sanguinea</i>	QJ4885539.1
8	400	400	90%	3e-133	98.56%	<i>Pycnoporus sp.</i>	KJ054413.1
9	400	400	90%	3e-133	98.56%	<i>Trametes sanguinea</i>	MZ305070.1
10	400	400	90%	3e-133	98.56%	<i>Trametes sanguinea</i>	JN154082.1

7. Secuencias obtenidas y usadas para el análisis:

```

PC081186_25
TTCCTAGGTTTACCTTCGGAAGATCAATACGAGTTCTGAAAGGGGTTTATGCTGGCCCTCCGGGGCA
GGGTCACAGCTCTGCTACCTTACAGCTGAGACATGACTGATGAGGTTGGGCTGGGCTCCGGGCTC
CGGCCTGAGGATCTCCGGGCTATGATACATACAAACACATAAAGTAAACAGATGTATTCGGCTC
TAGGCACTGAAAATACAACTTTAGCAAGCGGATCTCTGGGCTTCGGATCGATGAAAAAAGCGGACCA
    
```

8. Conclusiones:

La secuenciación de la región ITS para hongos, pudo identificar la muestra de acuerdo con los análisis de comparación BLAST de las bases datos del Genbank. Podemos concluir que los análisis de ITS, ayudan a determinar el género y la especie de acuerdo con las secuencias reportadas; por su análisis bioinformático, se ha podido determinar la especie putativa *Trametes sanguinea*, considerando a las especies de porcentaje de identidad mayor al 98%.

RUC: 2062842145

www.btsconsultores.pe



Figura 13. Recolección del material biológico (lado izquierdo), selección y desinfección de muestra de *Pycnoporus sanguineus*, *Pleurotus ostreatus* en el laboratorio (lado derecho).



Figura 14. *Pycnoporus sanguineus* muestras en madera descompuesta para estudio en laboratorio.

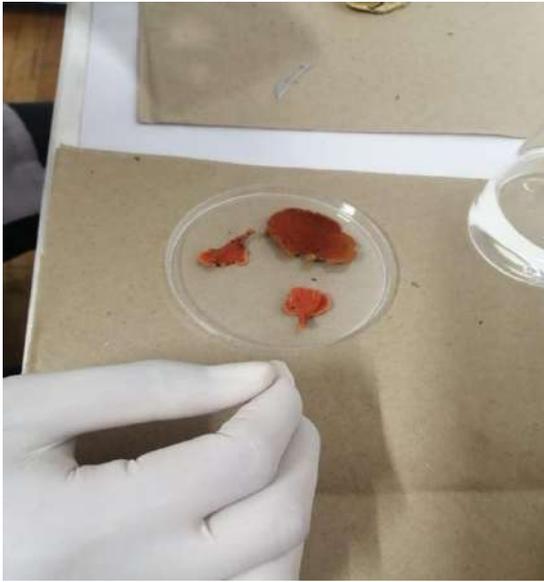


Figura 15. Muestras recolectadas de estudio *Pleurotus ostreatus* (derecho), *Pycnoporus sanguineus* (izquierda).



Figura 16. Desinfección de material biológico y siembra.



Figura 17. Bolsas de tierra contaminada con hidrocarburo procedente de San Juan Bautista, Loreto.



Figura 18. Preparación de medios para siembra de estudio.



Figura 19. Obtención de Cepas puras; *Pycnoporus sanguineus* (día 18) lado izquierdo, cepa de *Pleurotus ostreatus* (día 15) lado derecho.



Figura 20. Homogenización para inoculación y suspensión micelial de los basidiomicetos.



Figura 21. Macetas con muestra de suelo contaminado en suspensión de *Pleurotus ostreatus* (A), *Pycnoporus sanguineus* (B).



Figura 22. Análisis de parámetro de pH al suelo y temperatura en el sitio de ensayo.



Figura 23. Evaluación del porcentaje de la humedad y de materia orgánica.



Figura 24. Proceso de muestra para cromatografía de gases Método Fracción 1 (C6-C10) EPA METHOD 8015.

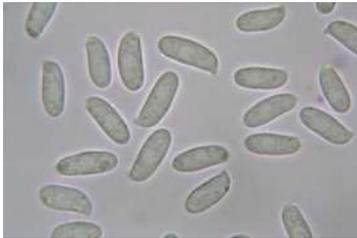
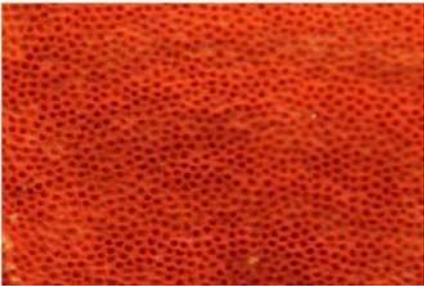


Figura 25. Destilación y colocación de la muestra del ensayo en viales para las lecturas en la cromatografía de gas.



Figura 26. NanoDrop 2000 espectrofotómetro de luz UV visible de espectro completo.

Tabla 15. Características de los hongos objetivos del estudio.

<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>Pycnoporus sanguineus</i>
<p>MACROSCOPICO</p> <p>Crece en forma de racimo</p> <p>Forma de ostra o sombrero</p> <p>Color marrón claro</p> <p>Mide de 6 – 15 cm</p> <p>Las láminas son de color crema apretadas y recurrentes lisas.</p>  <p>MICROSCOPICA</p> <p>Esporas de blancas a cremosas</p> <p>Basidios: doliformes y largos</p> <p>Cistidios: carece de ellos en la lamina</p> <p>Cutícula: filamentosos con sistema hifal monomítico con fíbulas.</p> 	<p>MACROSCOPICO</p> <p>Color anaranjado brillante cuando está húmedo, anaranjado amarillento cuando este seco.</p> <p>Presenta túbulos cilíndricos</p> <p>Forma de Luna</p> <p>Medidas varían 1.2 cm – 3.5 cm de largo x 1.5 cm – 5 cm de ancho x 0.1 cm -0.45 cm de grosor.</p> <p>Consistencia lisa, varias veces rugosa.</p>  <p>MICROSCOPICA</p> <p>Hifas de paredes delgadas, hialinas, ramificadas y anastomasado.</p> 

Problema	Objetivo	Hipótesis	Variables	Metodología	Técnicas	Instrumentos
Problema general	Objetivo general	Hipótesis general	Dependiente	Tipo de investigacion. Aplicativa Nivel de Investigacion Experimental		
Cual será la eficiencia de la suspensión biológica de <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Pycnoporus sanguineus</i> para remediar suelos contaminados con Hidrocarburo 2023?	- Determinar la eficiencia de la suspensión biológica de los dos tratamientos <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Pycnoporus sanguineus</i> para remediar los suelos contaminados con hidrocarburo.	- La eficiencia estará determinada por la suspensión biológica de <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Pycnoporus sanguineus</i> donde remediará eficientemente los suelos contaminados con hidrocarburo.	Biodegradacion del suelo contaminado			
Problema específico	Objetivo específico	Hipótesis específicos	Independiente	Poblacion: Poblacion definida por Hongos de la pobre dumbre blanca(basidiomicetos). Muestra: suelos contaminado de petroleo crudo de la localidad de San Juan Bautista - Loreto	Observacion experimental	Registro de campo, ficha de recoleccion de datos, camara, entre otros.
<ul style="list-style-type: none"> Cual será la acción de biodegradacion de los hongos <i>Pleurotus ostreatus</i>, <i>Pycnoporus sanguineus</i> frente a los suelos contaminados con hidrocarburo. Cual será la eficiencia de biodegradacion de hidrocarburo con <i>Pleurotus ostreatus</i>. Cual será la eficiencia de biodegradación de hidrocarburo con <i>Pycnoporus sanguineus</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> Determinar la acción de biodegradación de los hongos <i>Pleurotus ostreatus</i>, <i>Pycnoporus sanguineus</i> frente a los suelos contaminados con hidrocarburo. Determinar la eficiencia de biodegradación de hidrocarburo con <i>Pleurotus ostreatus</i> Determinar la eficiencia de biodegradación de hidrocarburo con <i>Pycnoporus sanguineus</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Los hongos <i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>Pycnoporus sanguineus</i> tendrán acción de biodegradativa de hidrocarburo en suelos contaminados. La biodegradación de hidrocarburo será eficiente con <i>Pleurotus ostreatus</i> La biodegradación de hidrocarburo será eficiente con <i>Pycnoporus sanguineus</i>. 	Accion del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Pycnoporus sanguineus</i>			

Matriz de Consistencia aplicado en el presente estudio.