



Universidad Técnica Federico Santa María
Sede José Miguel Carrera
Viña del mar

UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA SEDE VIÑA DEL MAR – JOSÉ MIGUEL CARRERA

TOLERANCIA DE PLEUROTUS OSTREATUS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PLOMO

Trabajo de Titulación para optar al
Título de Técnico Universitario en
CONTROL DEL MEDIO AMBIENTE

Alumna:
Beatriz Valeria Urrutia Alfaro

Profesor Guía:
María Elisa Escobar

Profesor Co-referente:
Bernardo Prado

RESUMEN

La biorremediación, un proceso mediante el cual los microorganismos vivos –a través su actividad metabólica- logran una descontaminación efectiva en un sistema. Hay algunos metales pesados, como el plomo, que son tóxicos aún en bajas concentraciones, pero que por medio de técnicas biorremediadoras es posible su reducción o eliminación. El presente Trabajo de título fue desarrollado en el laboratorio de microbiología de la Universidad Técnica Federico Santa María, Sede José Miguel Carrera. El objetivo fue ensayar mediante técnicas in vitro la tolerancia de la cepa fúngica *Pleurotus ostreatus* a diferentes concentraciones de plomo, de modo de dar base para que se pueda utilizar para biorremediar un ambiente contaminado con dicho metal pesado. Para esto, el hongo fue inoculado en condiciones óptimas para su desarrollo en placas Petri utilizando agar PDA como sustrato y contaminado con diferentes concentraciones de plomo en triplicado y se evaluó su tolerancia a éste de manera cualitativa. Las concentraciones a las que fue sometido el hongo fueron: 50 ppm, 150 ppm, 250 ppm, 350 ppm y 400 ppm, además de un respectivo blanco. El grado de tolerancia fue medido por el crecimiento radial en la presencia del metal y en comparación a la placa Control.

De los resultados obtenidos se observa que *Pleurotus ostreatus* puede crecer y desarrollarse a partir de los 50 ppm de plomo, pero no tolera concentraciones sobre los 450 ppm, la concentración máxima tolerable por éste se da en el rango de los 400 ppm.

PALABRAS CLAVES: Micorremediación, in vitro, *Pleurotus ostreatus*, tolerancia al plomo.

INDICE

I Introducción.....	1
Objetivos.....	2
II Revisión de la Literatura.....	3
1 Metales pesados.....	3
1.1 Contaminación por metales pesados.....	4
1.2 Efectos de los metales pesados.....	5
1.3 Plomo.....	6
2 Biorremediación.....	9
2.1 Fundamento bioquímico de la biorremediación.....	10
2.2 Mecanismos que se llevan a cabo durante la biorremediación de metales pesados.....	11
2.2.1 Bioacumulación y biosorción.....	11
2.2.2 Reacciones redox catalizadas bioquímicamente que producen inmovilización de metales.....	12
2.2.3 Solubilización catalizada biológicamente....	12
2.3 Tecnologías de biorremediación <i>in situ</i>	13
2.4 Tecnologías de biorremediación <i>ex situ</i>	13
2.5 Estrategias de biorremediación.....	14
2.5.1 Atenuación natural.....	14
2.5.2 Bioestimulación.....	14
2.5.3 Bioaumentación.....	15
2.6 Factores que limitan la biorremediación.....	15
2.7 Ventajas y desventajas de la biorremediación.....	16
2.7.1 Ventajas.....	16
2.7.2 Desventajas.....	16
3 Micorremediación.....	18
3.1 Mecanismos implicados en el proceso de remoción de metales por transformación biológica.....	19
3.1.1 Mecanismos fisicoquímicos.....	19
3.2 Mecanismos de resistencia.....	21
3.2.1 Mecanismos fisiológicos y genéticos.....	21
3.2.2 Mecanismos enzimáticos.....	21
4 Reino Fungi.....	23
4.1 Características.....	25
4.2 Clasificación.....	26
4.3 Morfología.....	27
4.4 Nutrición.....	30
4.5 Hábitat.....	32
4.6 Reproducción.....	33
4.7 Importancia del reino fungi.....	34
4.8 Hongos de la pudrición blanca.....	35
4.9 <i>Pleurotus ostreatus</i>	37
4.9.1 Taxonomía.....	37

4.9.2 Morfología.....	37
4.9.3 Mecanismo de biorremediación.....	38
III Parte experimental.....	39
1 Aislamiento <i>Pleurotus ostreatus</i> desde una bandeja Comercial.....	39
1.1 Materiales y equipos.....	39
1.2 Procedimiento.....	39
2 Aislamiento micelio <i>Pleurotus ostreatus</i>	40
3 Prueba Preliminar.....	40
3.1 Materiales y equipos.....	41
3.2 Procedimiento.....	41
4 Prueba Final.....	41
IV Resultados y Discusión.....	43
1 Resultados Prueba Preliminar.....	44
2 Resultados Prueba Final.....	45
V Conclusión.....	50
VI Recomendaciones.....	51
VII Bibliografía.....	52

SIMBOLOGÍA Y SIGLA

°C → Grados Celsius
Al → Aluminio
As → Arsénico
Ca → Calcio
Cd → Cadmio
cm → centímetro
Cr → Cromo
Cu → Cobre
CO₂ → Dióxido de carbono
Fe → Hierro
Hg → Mercurio
H₂O → Agua
HPB → Hongo de la pudrición blanca
HPC → Hongo de la pudrición café
IUPAC → Unión internacional de Química Pura y Aplicada
MP → Metal pesado
MO → Materia orgánica
ml → mililitro
N → Nitrógeno
Ni → Níquel
O₂ → Oxígeno
OSM → Organización mundial de la salud
P → Fósforo
Pb → Plomo
PB → Podredumbre blanca
PDA → Papadextrosa
Ppm → Partes por millón
Redox → Reacción de óxido reducción
Se → Selenio
T° → Temperatura
USEPA → Agencia de Protección Ambiental de EE.UU
Zn → Zinc

I INTRODUCCIÓN

Los metales pesados presentes en los productos y subproductos de actividades industriales o agrícolas, se han convertido en un problema gravísimo para los ecosistemas y en la salud de los organismos vivos en general, que a diferencia de otro tipo de contaminantes, la dificultad para removerlos de un medio radica en la imposibilidad última de destruirlos o biodegradarlos debido a su naturaleza química.

El impacto ambiental de los contaminantes metálicos en suelos y sedimentos es estrictamente dependiente de la capacidad de complejamiento de éstos con componentes del medio ambiente y su respuesta a las condiciones fisicoquímicas y biológicas de su entorno. Los metales pesados son especies químicas no biodegradables. Por tal motivo, una vez liberados al medio ambiente, solo pueden distribuirse entre los medio aire- agua- suelo, a veces cambiando su estado de oxidación o incorporarse a los seres vivos. A raíz de esto, se busca el desarrollo de tecnologías de detoxificación para dichos efluentes, y mejor aún, que sean amigables con el medio ambiente.

La biorremediación, mediante el uso de hongos aporta posibilidades para inmovilizar los metales en formas no biodisponibles, para convertir los iones de metales tóxicos en formas químicas más inocuas, o para reubicar de forma extensiva los metales. Por esta razón, el uso de los hongos de la podredumbre blanca, ofrece una herramienta multifuncional en los procesos de detoxificación, debido a características como hipertolerancia y acumulación de metales pesados en su pared, la presencia de diferentes sistemas enzimáticos para el tratamiento de compuestos xenobioticos y su vigoroso crecimiento les permite, a través del desarrollo de su micelio, colonizar diferentes áreas y así acceder a los compuestos que constituyen las contaminaciones más frecuentes de aguas y suelos.

El presente estudio experimental, evaluó la capacidad del hongo de la podredumbre blanca, *Pleurotus ostreatus* de tolerar determinadas concentraciones de plomo, un metal pesado altamente tóxico y recalcitrante. Chile no tiene definidos los límites máximos permisibles de metales pesados en el suelo, aun así, se rige bajo las normas internacionales de países como Alemania, Canadá y Holanda y el Estado de Sao Paulo, Brasil, bajo los cuales se ha desarrollado este experimento. El fin del presente trabajo experimental es dar base, mediante el análisis cualitativo, de que el *Pleurotus ostreatus* crece y tolera altas concentraciones de dicho metal, y así demostrar que esta especie es una gran alternativa para tratar ambientes contaminados con este metal pesado.

OBJETIVOS

- General: Determinar si *Pleurotus ostreatus* es capaz de tolerar diferentes concentraciones de plomo, mediante el crecimiento y desarrollo de su micelio sobre un sustrato contaminado con dicho metal pesado.
- Específicos: Comprender el correcto cultivo de *Pleurotus ostreatus*.
Aislar, reproducir *Pleurotus ostreatus* in vitro, a partir de una bandeja comercial.
Observar el crecimiento micelial sobre el sustrato contaminado con diferentes concentraciones de plomo para comprobar su tolerancia a este elemento.

II REVISIÓN DE LITERATURA

1. METALES PESADOS

La contaminación ya sea atmosférica, del agua o del suelo, constituye un grave problema de salud medioambiental que afecta a los países desarrollados y en vías de desarrollo por igual [OMS, 2008]. Los MP se encuentran en forma natural en la corteza terrestre, sin embargo, cuando son liberados al ambiente pueden llegar a convertirse en graves contaminantes ambientales.

Es de mencionar, que el término “metal pesado” no se encuentra bien definido, no se dispone de una definición oficialmente aceptada que provenga de alguna sociedad científica u organismo referente de alto nivel, como la IUPAC o la USEPA [Hawkes, 1997; Sengupta, 2002]. No obstante, la Asociación Latinoamericana de Microbiología, en su Revista Latinoamericana de Microbiología [2002], señala que los MP constituyen un grupo cercano a los 40 elementos de la Tabla periódica (Figura 1) que tienen una densidad mayor o igual a 5 g/cm³ en su forma elemental, tienen propiedades metálicas, se incluyen metales de transición, algunos semimetales, lantánidos y actínidos. Éstos presentan diferentes características fisicoquímicas, se encuentran formando complejos como iones libres o participando en reacciones redox que resultan potencialmente tóxicas para los organismos [Marrero et al., 2010].

1 IA																	13 IIIA	14 IVA	15 VA	16 VIA	17 VIIA	18 VIIIA			
1 H	2 He																	5 B	6 C	7 N	8 O	9 F	10 Ne		
3 Li	4 Be																	11 Na	12 Mg	13 Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar
19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr								
37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe								
55 Cs	56 Ba	57 La	72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn								
87 Fr	88 Ra	89 Ac	104 Rf	105 Db	106 Sg	107 Bh	108 Hs	109 Mt	110 Uun	111 Uuu	112 Uub	114													
Lantánidos			58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb	71 Lu									
Actínidos			90 Th	91 Pa	92 U	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No	103 Lr									

Figura 1. Tabla periódica

Los MP son notables por su amplia gama de usos, su dispersión, su tendencia a acumularse en algunos tejidos del cuerpo y su potencial de ser tóxicos aún a

niveles de exposición relativamente bajos [Howard Hu, 2002]. El rasgo distintivo de la fisiología de los metales pesados, es que aun cuando muchos de ellos son esenciales para la fisiología animal (como el Cu y Fe) se ha reportado que también tienen efectos tóxicos sobre las células, principalmente como resultado de su capacidad para alterar o desnaturalizar las proteínas [Revista Ambiental, 2004] si se es expuesto a altos niveles de concentración [Sherameti I. & Varma A., 2010]. Otros metales al ser xenobióticos, no tienen ninguna relevancia en los procesos fisiológicos, como el caso del Pb y Hg.

La acción toxica de los MP sobre los seres vivos ocurre a través del bloqueo de las actividades biológicas, es decir, la inactivación enzimática producto de la formación de enlaces entre el metal y los grupos sulfhidrilos (-SH) y otros grupo funcionales de las proteínas y enzimas, causando daños irreversibles en los diferentes organismos, desplazando otros iones metálicos o modificando la conformación activa de moléculas biológicas [Garbisu y Alkorta, 2003; Rajendran et al., 2003]. Para que los MP puedan ejercer su toxicidad sobre un ser vivo, éstos deben encontrarse biodisponibles para ser captados por este. El concepto de biodisponibilidad se encuentra íntimamente relacionado con las condiciones fisicoquímicas del ambiente y la afinidad de los iones metálicos con la superficie de la adsorción de los componentes del recurso, que determinan la especificación y por lo tanto, la concentración del metal libre y lábil. Por ello es fundamental determinar el grado de contaminación por MP de un ambiente, conocer su biodisponibilidad, es decir, la concentración del metal presente en la muestra [Gonzalez Rojas, et al. Edwin, 2010].

1.1 Contaminación por metales pesados

Según el Instituto de salud pública de Chile (ISPCH), se denomina contaminación a la presencia en el ambiente de cualquier agente (físico, químico o biológico), o una combinación de varios agentes en lugares, formas y concentraciones tales que sean o puedan ser nocivos para la salud, seguridad o bienestar de la población, ser perjudiciales para la vida vegetal o animal, o impida el uso normal de las propiedades y lugares de recreación y goce de los mismos [ISPCH.cl].

La contaminación es un concepto de connotación negativa, se produce por la introducción de una sustancia nociva o contaminante o alguna forma energética, que altera el medio al que se introduce, desequilibrándolo. Estos contaminantes tienden a dispersarse, incluso transfiriéndose fuera de un medio invadiendo otros, y elevar su grado de contaminación al mezclarse con otros contaminantes.

El riesgo ambiental de los MP está relacionado con una exposición (contenido) adicional, generalmente elevada y de origen antropogénico. A nivel mundial existe una gran preocupación por la contaminación de suelos con metales pesados, ya que ésta es considerada irreversible, irrecuperable y con elevado riesgo de fito y zootoxicidad. Cada metal posee ciertas características como: toxicidad del metal

(especie química), nula degradación ambiental, alta resiliencia y bioacumulación [Marbán, 2008].

Los metales son especies químicas no biodegradables. Es por esto que, una vez emitidos al medio ambiente, solo pueden distribuirse entre el medio ya sea, agua, aire, suelo, a veces cambiando su estado de oxidación o incorporarse a los seres vivos. Los procesos de adsorción y la formación de complejos en medios naturales son responsables de que la mayor parte de los vestigios de MP se acumulen a los sólidos en suspensión, incorporándose rápidamente a los sedimentos. Por su parte, las aguas, en contacto directo con los sedimentos, actúan como fuente de estos contaminantes y en ellas se observan concentraciones intermedias entre las aguas superficiales y los sedimentos [Buffle, J., Scott Altmann, R., 1987; Hurtsthouse, A.S, 2001; Kalbitz, K. and Wennrich, R., 1998; Kretzschmar, H. and Sticher, H., 1997]. Por lo que deben tratarse de manera tal para disminuir su toxicidad y/o disponibilidad.

La toxicidad está causada frecuentemente por la imposibilidad del organismo afectado para mantener los niveles necesarios de excreción. El proceso se agrava durante el paso por las distintas cadenas tróficas, debido a que los niveles de incorporación sufren un fuerte incremento a lo largo de sus sucesivos eslabones, este proceso se conoce como biomagnificación [Navarro Aviñó, J.P., Aguilar Alonso, I., López- Moya, 2007].

El impacto ambiental de los contaminantes metálicos en suelos y sedimentos es estrictamente dependiente de la capacidad de complejamiento de éstos con componentes del medio ambiente y su respuesta a las condiciones fisicoquímicas y biológicas de su entorno.

1.2 Efectos de los metales pesados

Los efectos biológicos de los metales pesados se pueden clasificar en físicos, químicos y fisiológicos. Estos efectos varían, dependiendo de la naturaleza física o química del compuesto, la cantidad o concentración que entra o se pone en contacto con el organismo, la forma en que entra en éste y la presencia o ausencia de otras sustancias que pueden incrementar o disminuir los efectos [Agency for Toxic Substance and Disease Registry. Toxicological Profile for Lead, U.S. Department of Health and Humans Services, Public Health Service, Centers for Diseases Control, Atlanta, GA. 2005].

Debido a la movilidad de estos elementos en los ecosistemas naturales y a su toxicidad para el sistema biótico, los iones metálicos en general son considerados a nivel mundial como los contaminantes inorgánicos más importante en el

ambiente, por su carácter recalcitrante y poder de biomagnificación, sus concentraciones pueden llegar a ser tóxicas, planteando graves problemas para la perdurabilidad de los ecosistemas y a la salud [Mejía Sandoval, Gregory, 2006]. La solubilidad y movilidad de los metales, dependen de su estado de oxidación y de su forma iónica.

La concentración de metales que se pueden acumular en el cuerpo humano, varía según el ambiente donde se viva y la exposición que se tenga a éstos (alimentos, agua, trabajo, etc.). La dinámica de los efectos es directamente proporcional a las concentraciones acumuladas a través del tiempo en los organismos vivos, debido a la continúa exposición a los metales pesados [Environmental research, 1977]. Desde el punto de vista toxicológico, son importantes por ser responsables de un gran número de intoxicaciones agudas y crónicas, pudiendo causar la muerte. Por esta razón se consideran importantes dentro de las enfermedades ocupacionales [Cortuelo Minguez, Luis M.; Marqués Gutiérrez, María Dolores, 1999; et al Julio Gutiérrez López].

También se han comprobado efectos genotóxicos en diferentes células de tejidos animales y vegetales expuestas a metales pesados en el tiempo. En células vegetales, la exposición reiterada a diferentes concentraciones de iones metálicos conlleva a una drástica reducción en el crecimiento de las raíces, tallo y hojas, además de un grave efecto en la división celular en los diferentes tejidos vegetales [Harper J. F., 2000; Knasmöüller S., 1998].

1.3 Plomo

El Plomo es uno de los metales más usados, ubicuos conocidos por los humanos, es detectable en prácticamente todas las fases del medio ambiente y los sistemas biológicos (su porcentaje en la corteza terrestre es alrededor de 0,00002%) [INHEM, 1992]. Los niveles medio ambientales de Pb han sido incrementados al menos más de mil veces en los últimos tres siglos, el gran aumento se dio entre los años 1950 y 2000. El Pb es un elemento químico de número atómico 82, que se encuentra en el grupo 14 (IV A) de la tabla periódica, con un peso atómico de 207,2 (Figura 2), con valencias químicas de +2 y +4; es de color gris azulado, flexible, inelástico, se funde con facilidad y es relativamente resistente al ácido sulfúrico y clorhídrico, pero se disuelve con lentitud en ácido nítrico, usualmente combinado con dos o más elementos para formar componentes de Pb [Agency for Toxic Substance and Disease Registry, 2005]. Tiene una densidad relativa o gravedad específica 11.4 g/cm³ a 16° C, resistente a la corrosión, su punto de fusión es 327.4° C y el de ebullición es 1725° C.

82	207,19 2,4
1725 327,4 11,4	Pb
(He)4f ¹⁴ 5d ¹⁰ 6s ² 6p ²	
Plomo	

Figura 2, Pb como elemento químico

El Pb es anfótero ya que forma sales de Pb de los ácidos (sales metálicas del ácido plúmbico), además de formar óxidos y compuestos organometálicos [Maqueda, 2003]. Es 11,4 veces más denso que el agua y se obtiene principalmente de la galena (Sulfuro de Pb) (Figura 3), la anglesita (sulfato), la cerusita (carbonato), la corcoita (cromato), la wulfenita (molibdato), piromorfita (fosfato), la mutlockita (cloruro) y la venadinita (vanadato), y generalmente está asociado a diversos minerales de zinc y en pequeñas cantidades con el cobre, cadmio y hierro [Volke- Sepúlveda et al., 2005]. En muchos casos, los minerales de plomo pueden contener otros metales tóxicos [Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo] como As, Hg y Zn.



Figura 3, Mineral de Pb (Galena).

El Pb es un metal blando y pesado, carente de valor biológico, es decir, no es requerido para el funcionamiento normal de los seres vivos.

Aproximadamente un 40% se usa en forma metálica, 25% en aleaciones y un 35% en compuestos químicos [Organización Internacional del Trabajo, 1998]. El Pb es utilizado en forma de planchas o tubos cuando se requiere una gran maleabilidad y resistencia a la corrosión, como en la industria química o en la de construcción. También se usa para el revestimiento de cables, como componente de soldadura

y como empaste en la industria automovilística. Es un material excelente como protector de radiaciones ionizantes. Se utiliza en diversidad de productos como compuestos antidetonantes para gasolinas, baterías, pinturas y cerámicas. Es un metal que se puede reutilizar [Lunas & Barajas, 2009]. Constituye un peligro ambiental cuando se lo utiliza con compuestos químicos [Dickson, 1999].

La concentración máxima de compuestos de Pb orgánico (alquilos) en las gasolinas está sujeta a restricciones legales en muchos países y a limitaciones de los fabricantes con apoyo gubernamental en otros. En muchos lugares se ha prohibido su uso por completo.

La principal vía de exposición para la población general es por la ingesta de comida y aire, mientras que la exposición ocupacional a este metal ocurre en los trabajadores de plantas de esmaltado e industria de refinería, manufactura de baterías, plásticos y pinturas. Los niños son los más sensibles a los efectos de este metal [Biology online. org, 2007].

El plomo entra al cuerpo a través de la absorción intestinal por medio de la ingestión; a los pulmones ingresa a través de la inhalación y en la piel por adsorción; el Pb que ha ingresado al organismo es transportado por medio del torrente sanguíneo a todos los órganos y tejidos. Una vez que el Pb ha sido absorbido puede acumularse en huesos, dientes, hígado, pulmón, riñón, cerebro y bazo; asimismo, es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y placenta [Goyer RA, Clarkson WT, 2001]. La vida media de Pb puede ser considerada más larga en niños que en adultos, tiene en la sangre una vida estimada de 35 años, mientras que en tejidos blandos es de 40 días y en huesos de 20 a 30 años [Papanikolaou CN, Hatzidaki GE, Belivanis S, Tzanakakis GN, Tsatsakis MA., 2005], siendo la principal ruta de excreción para el Pb absorbido el tracto urinario, usualmente con un filtrado glomerular en el riñón [Goyer RA, Clarkson WT, 2001]. Los órganos más sensibles al daño por la toxicidad en exposiciones agudas del plomo son el sistema nervioso central en desarrollo y maduro, sistema hematológico y cardiovascular, mientras que en las exposiciones crónicas el Pb afecta los sistemas gastrointestinal, renal, neuromuscular y hematopoyético [Flora SJS, Mittal M, Mehta A., 2008]. Los niveles de Pb en sangre debajo de los 10 $\mu\text{g/dL}^{-1}$ son los considerados aceptables [CDC, 1991].

Clínicamente los síntomas más importantes que se observan en la intoxicación por Pb son: dolor de cabeza, irritabilidad, dolor abdominal y otros relacionados con el sistema nervioso central en intoxicaciones agudas. Mientras que en la intoxicación crónica en humanos, con frecuencia desarrolla torpeza, irritabilidad, falta de atención, vómito y convulsiones y en ocasiones hasta la muerte.

Cuando el Pb entra en las células de la planta, produce varios efectos adversos en los procesos fisiológicos, entre los que se encuentra la inhibición de la actividad

enzimática, alteración de la nutrición mineral, desequilibrio hídrico, cambios en el estado hormonal y alteración en la permeabilidad de la membrana celular. Estos trastornos fisiológicos por las altas concentraciones de Pb pueden llevar a la planta a la muerte [Ernst 1998, Seregin e Ivanov 2001].

Al no ser un elemento biodegradable, el Pb se convierte en una amenaza para el ambiente. Las técnicas de remediación convencionales se basan principalmente en la excavación del suelo contaminado y posterior procesamiento fisicoquímico del mismo. Sin embargo, estos procesos son costosos, poco prácticos y causan daños secundarios al ambiente. A raíz de esto, existen estudios que mencionan que los hongos poseen habilidades de captación de metales pesados, gracias a que en su pared celular contienen diversos componentes quelantes tales como grupos carboxilo, fosfatos, amidas, tioles, hidroxilos, quitina, gluco- proteínas, las cuales jugarían un rol importante en la bioadsorción de MP [Enamorado et. al., 2011].

2. BIORREMEDIACIÓN

El rol de los microorganismos es fundamental en los ciclos biogeoquímicos de los elementos y su utilización en los procesos de biorremediación de desechos sólidos y líquidos es esencial para el cuidado del medio ambiente. Dentro de la amplia diversidad microbiana, existen microorganismos resistentes y/o tolerantes que son de particular interés como captadores de metales en sitios contaminados, debido que ambos pueden extraer los contaminantes y participar en el proceso de biorremediación [Lovley, 2000].

La creciente demanda por buscar maneras de conservar áreas naturales y/o restablecer a su estado original aquellas que han sido contaminadas por el progreso del hombre [Castillo R. F., 2005]; en la búsqueda de soluciones, nos hemos encontrado con la biorremediación, que se conoce como una técnica que utiliza el potencial metabólico de los microorganismos vivos (bacterias, hongos, levaduras, algas, enzimas) para catalizar la degradación o transformación de xenobióticos, con el fin de remediar, restaurar, restablecer o devolver un suelo, agua o aire a un estado limpio, libre de contaminantes o al menos disminuir su concentración a niveles que sean menos tóxicos para integrarlos en los ciclos biogeoquímicos naturales o de acumularlos en su biomasa, reduciendo así, la concentración del contaminante en el medio [Rivera et. al., 2003].

Este bioproceso está surgiendo como una prometedora tecnología, se basa en que muchos de los compuestos xenobióticos son semejantes a los naturales y, por tanto, factibles de degradarlos o inertizarlos. No obstante, hay algunos compuestos más complejos, difíciles de biodegradar. La biorremediación puede

emplear organismos propios del sitio contaminado (autóctonos) o de otros sitios (exógenos), en condiciones aerobias (en presencia de oxígeno) o anaerobias (sin oxígeno) [Volke, T. & Velasco, J.A., 2002].

El campo de aplicación de la biorremediación es amplio, pudiendo considerarse como objeto cada uno de los estados de la materia [González- Rojas, 2004]:

- Sólido: con aplicaciones sobre medios contaminados como suelos o sedimentos, o bien directamente en lodos, residuos, etc.
- Líquido: aguas superficiales y subterráneas, aguas residuales.
- Gases: emisiones de industrias, así como productos derivados del tratamiento de aguas o de suelos.

Se debe realizar un amplio estudio sobre el área a descontaminar antes de escoger el método para la remoción del contaminante. Es necesario tomar en cuenta los contaminantes presentes en el lugar y su concentración, el medio ambiente en el que existen (suelo o agua, accesibilidad) y la extensión del área contaminada.

La biorremediación llega a ocurrir naturalmente, se sabe que los microorganismos autóctonos tienen la capacidad de adaptarse y eventualmente degradar compuestos potencialmente tóxicos sin asistencia del hombre, sin embargo, esta adaptación requiere condiciones ambientales apropiadas tales como el pH, temperatura, un aceptor final de electrones (que en procesos aeróbicos es el oxígeno), nutrientes y adecuadas condiciones de humedad y conductividad del medio, entre las más importantes. La ausencia de alguna o varias de estas condiciones, puede limitar parcial o totalmente la actividad biológica y es cuando la mano del ser humano juega un papel fundamental en la optimización del proceso ya sea mejorando estas condiciones para aumentar la población de microorganismos (bioaumentación) y/o manipulando genéticamente los microorganismos para la degradación, eliminación específica de algunos compuestos químicos [Katherine Torres, Tatiana Zuluaga, 2009].

2.1 Fundamento bioquímico de la biorremediación

Su fundamento se basa principalmente en la serie de reacciones redox (cuyo fin es la obtención de energía) que se producen en la cadena respiratoria o transportadora de electrones de las células. La cadena la inicia un sustrato orgánico que es externo a la célula y que actúa como dador de electrones, de modo que la actividad metabólica de la célula acaba degradando, eliminando y consumiendo dicha sustancia [Arroyo y Álvarez & Illiman, 2006].

Los aceptores más comúnmente utilizados por los microorganismos son el oxígeno, los nitratos, el hierro (III), los sulfatos y el dióxido de carbono. Cuando el oxígeno es utilizado como aceptor de electrones la respiración microbiana se produce en condiciones aerobias, y los procesos de biodegradación serán de tipo aerobio; de lo contrario, si utiliza los sulfatos o el dióxido de carbono, se produce en condiciones reductoras o anaerobias, y los procesos de biodegradación serán de tipo anaerobio [Maroto Arroyo, M^o Esther & Rogel Quesada] (Figura 4).

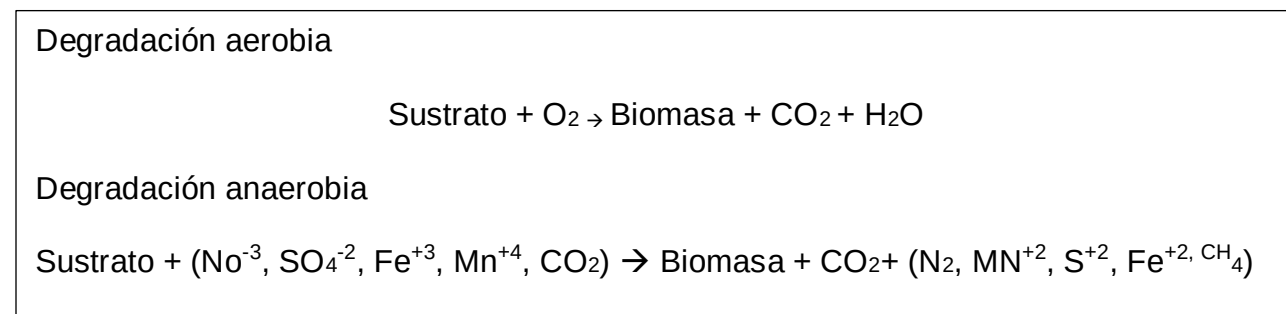


Figura 4. Esquema de las reacciones

2.2 Mecanismo que se lleva a cabo durante la biorremediación de metales pesados

En los procesos de biorremediación, los organismos vivos usan su potencial metabólico (catabolismo) para transformar contaminantes en compuestos más simples como fuente de carbono y energía [Watanabe, 2001; Álvarez & Illiman, 2006; Castillo et. al., 2005; Mulas, 2008].

Cuando se lleva a cabo este proceso, generalmente se presentan tres tipos de mecanismos: la mineralización, la biotransformación y la bioacumulación. Estos procesos, incluyen reacciones redox, procesos de sorción, intercambio iónico e incluso reacciones de quelación que provocan la inmovilización de metales [Mulas, 2008]. Sin embargo, la biorremediación de metales pesados solo se puede llevar a cabo mediante la Biotransformación, ya que como se ha mencionado, no son compuestos biodegradables.

Algunas veces, los compuestos en la naturaleza no se mineralizan, sino que se transforman en otros diferentes (cambio químico) que pueden ser incorporados por el propio organismo que los transforma o secreta al medio ambiente [Casal & Rojo, 2004], a este mecanismo se le conoce como biotransformación [Castillo et. al., 2005].

El objetivo de la biotransformación, es modificar los compuestos xenobióticos o tóxicos a través de procesos bioquímicos que los transformen en sustancias más ionizadas, hidrosolubles y fácilmente eliminables, a través de una serie de

enzimas no integradas en las vías del metabolismo energético o intermediario del organismo [Camargo, 2015]. En términos generales, las reacciones de biotransformación generan metabolitos inactivos, más polares e hidrosolubles para su eliminación.

Existen tres categorías básicas de este proceso que pueden afectar a la movilidad y a la toxicidad de los metales pesados [McCullough et. al, 1999]:

2.1.1 Bioacumulación y biosorción

La bioacumulación consiste en la retención de metales en el citoplasma de los microorganismos, mediante su transporte a través de la membrana celular (con gastos de energía), gracias a la acción de proteínas específicas de transporte. Este consumo energético se genera a través del sistema H^+ ATPasa. Una vez incorporado el MP al citoplasma, éste es secuestrado por las proteínas ricas en grupos sulfhidrilos llamadas *metalotioneínas* o también puede ser compartimentalizados dentro de una vacuola, como es en el caso de los hongos.

Aquí se aprovecha la habilidad que tienen algunos organismos (como los hongos) de inmovilizar compuestos altamente tóxicos mediante la precipitación o formación de complejos insolubles [Casa & Rojo, 2011].

La biosorción por su parte, es el segundo proceso importante eliminación de metales/contaminantes del medio ambiente por los hongos, y consiste en la inmovilización de los iones metálicos, con carga positiva, mediante la adsorción a los grupos iónicos negativos existentes en la superficie celular, y a los polisacáridos de la cubierta exterior de la mayoría de los microorganismos. Es un mecanismo de cinética rápida que no presenta una alta dependencia con la temperatura.

2.1.2 Reacciones redox catalizadas biológicamente que producen inmovilización de metales

Los microorganismos reductores de metales producen una reducción enzimática directa de las formas oxidadas del metal, utilizándolos como aceptores alternativos de electrones.

Además de la reducción enzimática directa de MP, algunos microorganismos, pueden llevar a cabo la reducción indirecta de especies oxidadas solubles. Esto se produce acoplando la oxidación de compuestos orgánicos a la reducción del Fe^{+3} , Mn^{+4} y SO_4^{-2} . Las especies reducidas Fe^{+2} , Mn^{+2} y H_2S , interaccionan químicamente con los metales contaminantes solubles produciendo especies multicomponentes insolubles que precipitan.

2.1.3 Solubilización catalizada biológicamente

La solubilización de metales biosorbidos y coprecipitados puede producirse por procesos microbianos tanto de forma directa como indirecta, aunque la solubilización de MP a partir de coprecipitados con las fases minerales, requiere una solubilización parcial de dichas fases minerales, óxidos principalmente.

Asimismo, la creación de ácidos orgánicos durante el metabolismo de los microorganismos, es capaz de bajar el pH del sistema, hasta valores que permitan interferir con las cargas electrostáticas que mantienen unidos los MP a la superficie de los óxidos e hidróxidos de hierro y ser desplazados por los iones de hidrogeno liberados al sistema.

Otro mecanismo de movilización de MP es mediante la acción de metabolitos que actúan como quelatos creándose complejos solubles quelatos-metal.

2.3. Tecnologías de biorremediación *in situ*.

Se trata de las acciones que se llevan a cabo en el lugar de interés. Hace referencia al uso de tecnologías de remediación en el sitio específico donde se ubica la contaminación; es decir que la aplicabilidad de técnicas se le realiza a los sitios que se desean recuperar en forma directa sin necesidad de excavaciones para “trasladar el sitio” [AMBIENTUM, 2014].

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

Es la técnica más aplicada y utiliza microorganismos autóctonos del lugar que pueden degradar, eliminar un gran número de contaminantes, pero su eficiencia y su población son afectadas en función de la concentración de los contaminantes [Benavidez Loper De Mesa, J., 2006].

La reintroducción de los microorganismos aislados de un sitio contaminado ayuda a resolver este problema ya que los microorganismos pueden degradar, eliminar sustancias y tienen una gran tolerancia a la toxicidad.

2.4 Tecnologías de biorremediación *ex situ*.

Son los tratamientos donde se realiza extracción del área contaminada para ser ubicada en un sitio diferente, son fundamentales dos tratamientos que se llevan a cabo: vía suspensión y vía sólida. La biorrecuperación vía sólida se puede realizar

por dos métodos: tratamiento en lechos y por compostaje. La diferencia más relevante entre estos dos tipos de tratamiento se basa en el modo de aireación, en el primero solo se pueden tratar las capas de suelo más profundas, mientras que en el compostaje se requiere la formación de grandes apilamientos de materia degradable.

En el tratamiento vía suspensión, se excava el material contaminado y se traslada a un reactor. La característica de este método es la suspensión en un medio acuoso del suelo contaminado, es decir, el tratamiento se lleva a cabo bajo condiciones de saturación de agua. La ventaja de estos procedimientos frente a los primeros, radica en la posibilidad de optimizar mejor los parámetros microbiológicos así como el control del proceso, a cambio de un mayor costo.

2.5. Estrategias de biorremediación

Aunque los procesos que tienen lugar durante la biorremediación ocurren, por lo general, de manera natural cuando se desarrolla un tratamiento que implica el uso de este tipo de técnica, el interés es alcanzar los objetivos en intervalos de tiempo más cortos y que su aplicación sea viable y efectiva. Para suplir estas necesidades es conveniente la intervención del medio contaminado, a través de estrategias como la bioestimulación o bioaumentación [USEPA, 2001; Swannell, et. Al., 1996].

2.5.1 Atenuación natural

La atenuación natural o también conocida como biorremediación intrínseca, se lleva a cabo gracias a la acción de los microorganismos autóctonos del medio afectado [Rosenberg & Ron, 1996; Spain, 1997; Watanabe, 2001]. Estos utilizan su potencial enzimático para mineralizar (biodegradar completamente hasta CO_2) los compuestos orgánicos o bien, simplemente degradarlos hasta productos intermedios, ya sea en presencia o ausencia de oxígeno. En otras ocasiones las transformaciones co-metabólicas (llevadas a cabo por enzimas que metabolizan simultáneamente otros compuestos como fuente de carbono) [Sanchez & Gallego, 2005] son las responsables de la biodegradación. De cualquier manera, se realiza mediante procesos físicos, químicos y biológicos que espontáneamente se da entre los componentes del suelo, el agua, los microorganismos del lugar afectado, con posterior aparición de la contaminación en el sitio. Esta estrategia no requiere intervención tecnológica y se distinguen dos modelos: uno que ocurre en presencia de oxígeno o de un medio oxidante como los nitratos y el hierro (III) y otros en ausencia de éste o de un medio reductor como sulfatos o dióxido de carbono [Camargo, 20015], pudiendo ser utilizados como sustratos, compuestos orgánicos como azúcares, proteínas lípidos e inclusive petróleo.

2.5.2 Bioestimulación

La bioestimulación consiste en la modificación de las condiciones ambientales del medio contaminado para favorecer o potenciar la atenuación natural. Se lleva a cabo mediante el aporte de nutrientes (como nitrógeno y fósforo), aireación (O_2), dadores de electrones (como compuestos de hierro o nitratos para los procesos anaerobios y etanol o ácido láctico para procesos aerobios), aceptores de electrones (como oxígeno y nitratos para procesos aerobios) o por ajustes de pH [Gallego et. al., 2001; Gallego et. al., 2005]. Esta técnica se basa en que los microorganismos autóctonos son capaces de degradar, eliminar el contaminante tras un proceso más o menos largo de aclimatación.

En este sistema, el agua subterránea es conducida a la superficie por medio de un sistema de pozos de extracción, se acondiciona en un reactor para volverla a inyectar y estimular la degradación bacteriana de los contaminantes del subsuelo y del acuífero. En el reactor en superficie se agregan al agua: nutrientes, oxígeno, microorganismos previamente seleccionados adaptados, y el efluente se retorna al subsuelo por medio de pozos de inyección, aspersores superficiales o galerías. Algunas veces esta técnica utiliza biosurfactantes para ayudar al lavado de contaminantes del suelo. Los suelos deben ser lo más homogéneo posible, con un valor de porosidad y permeabilidad al aire adecuado, además de tener las condiciones óptimas.

2.5.3 Bioaumentación

La bioaumentación es la adición de microorganismos especializados y exógenos al medio con el fin de potenciar la remediación [Walter, 1997; Atlas & Unterman, 1999] y de esta manera destruir, inmovilizar o minimizar la concentración de los contaminantes de interés [Sánchez & Rodríguez, 2010]. El objetivo es optimizar la biodegradación de microorganismos autóctonos especializados para aumentar la eficiencia. Comúnmente, se utiliza la bioaumentación para modificar el tiempo de aclimatación o adaptación al sitio contaminado y al contaminante, haciendo que la biodegradación comience antes y se evite el riesgo toxicológico hacia plantas, animales y humanos [Mulas, 2008].

Tanto la bioestimulación como la bioaumentación, son estrategias que implican la circulación de oxígeno a través de un suelo contaminado para mejorar la biodegradación de contaminantes orgánicos o la inmovilización de contaminantes inorgánicos [Van Leeuwen, et. al., 1997].

2.6 Factores que limitan la biorremediación

La estructura de la matriz contaminante puede ser uno de los factores más importantes y por eso debe estar muy bien caracterizada. Por otro lado, factores físicos como la temperatura, el pH y la humedad siempre deben estar tomados en cuenta, ya que afectan directamente a las características químicas de los compuestos contaminantes, como su solubilidad en agua, así como a la fisiología y diversidad de la microbiota autóctona del suelo [Das & Chandran, 2011]. Además, la presencia de tanto nutriente inorgánico (nitrógeno, fósforo, potasio, etc) como aceptores de electrones es básica para que las tecnologías implementadas tengan resultados aceptables.

2.7 Ventajas y Desventajas de la Biorremediación

2.7.1 Ventajas

- Mientras que los tratamientos físicos y buena parte de los químicos están basados en transferir la contaminación entre medios gaseosos, líquidos y sólidos, en la biorremediación se transfiere poca contaminación entre un medio a otro.
- Los microorganismos son adaptables y pueden degradar una inmensa diversidad de moléculas bajo condiciones muy diferentes de humedad, temperatura, pH, fuentes de alimento, etc.
- Ayuda en la destrucción completa de contaminantes, muchos de los compuestos peligrosos pueden transformarse en productos inocuos, esta característica también elimina la posibilidad de responsabilidad futura asociada con el tratamiento y la eliminación de material contaminado.
- No utiliza productos químicos peligrosos. Es una tecnología poco invasiva y generalmente no requiere componentes estructurales o mecánicos que signifiquen una amenaza para el medio.
- Comparativamente, es económica, viable y al tratarse de un proceso natural, suele tener aceptación por parte de la opinión pública.
- Ecológica y sostenible.
- No intrusivo, permitiendo potencialmente el uso continuo del sitio.

2.7.2 Desventajas

- La biodegradación incompleta puede generar intermediarios metabólicos inaceptables, con un poder contaminante similar o incluso superior al producto original y algunos compuestos contaminantes son tan resistentes que pueden incluso inhibir la biorremediación.
- Es difícil predecir el tiempo requerido para un proceso adecuado y el seguimiento y control de la velocidad y /o extensión del proceso es dispendioso [King, 1997].
- Los procesos biológicos son a menudo altamente específicos. Los factores importantes del sitio requeridos para el éxito incluyen la presencia de poblaciones microbianas metabólicamente capaces, condiciones de crecimiento ambiental adecuadas y niveles apropiados de nutrientes y contaminantes.
- Se necesita investigación para desarrollar tecnologías de biorremediación que sean apropiadas para sitios con mezclas complejas de contaminantes que no estén dispersas de manera uniforme en el medio ambiente. Los contaminantes pueden estar presentes como sólidos, líquidos y gases.

3. MICORREMEDIACIÓN

Término acuñado por Paul Stamets [1998], definido como una forma de biorremediación utilizando hongos, basándose en su propio funcionamiento en la naturaleza para degradar, bioacumular o retener los contaminantes en el ambiente. Lográndolo con la estimulación de la actividad enzimática y microbiana del micelio.

Los hongos poseen la capacidad bioquímica y ecológica para degradar los químicos orgánicos ambientales y disminuir el riesgo asociado con los metales, metaloides y radionúclidos, ya sea por modificación química o al influir en la biodisponibilidad. Además, la capacidad que tienen los hongos de formar redes miceliales extendidas, la baja especificidad de sus enzimas catabólicas y el uso de contaminantes como sustratos de crecimiento hacen que los hongos sean adecuados para los procesos de biorremediación. Poseen la habilidad de modificar la permeabilidad del suelo, su capacidad de intercambio iónico y desintoxicar suelos contaminados [Singh, 2006]. Así mismo, pueden absorber y en algunos casos acumular las sustancias presentes en el sustrato. Es por ello, que a través del análisis del contenido de MP y radionúclidos en los esporomas, se puede conocer si un área está contaminada y en qué grado [García et. Al., 1998].

Las enzimas fúngicas que degradan los contaminantes incluyen varias oxido-reductasas extracelulares que principalmente descomponen la lignina y celulosa-compuestos orgánicos formados por largas cadenas de carbono e hidrogeno, estructuralmente similar a muchos contaminantes orgánicos-, los dos componentes principales de la fibra vegetal, así como las enzimas unidas a las células, esto permite que los hongos actúen sobre una amplia gama de contaminantes.

Algunos tienen la capacidad no solo de absorber sino también de acumular grandes cantidades de sustancias contaminantes, con preferencia por una sustancia sobre otra, en ocasiones superando en miles de veces lo que se encuentra en el lugar donde crecen, por lo que se pueden aprovechar en biorremediación al catalizar la destrucción o transformación de compuestos peligrosos [Stamets 2005; Kornilowicz- Kowalska et. Al., 2006; Quintero Díaz, 2011]. Una característica distintiva de este grupo de microorganismos son los constituyentes de su pared celular (quitina, quitosano, polifosfatos, lípidos y proteínas), que les proporcionan excelentes propiedades para unir metales a través de grupos funcionales cargados negativamente como aminos, hidroxilos, carboxilos, sulfhidrilos y fosfatos, que permiten la captura o inmovilización de estos compuestos [Aydin et. Al., 2016].

3.1 Mecanismos implicados en el proceso de remoción de metales por tratamiento biológico

3.1.1 Mecanismos fisicoquímicos

La pared celular realiza la retención del metal mediante una interacción fisicoquímica de ésta con grupos amino e hidroxilo propios de la quitina presentes en la pared, al igual que grupos fosfatos, sulfhidrilo y carboxilo. Esta interacción se traduce en la formación de un enlace covalente coordinado, pues el ion metálico actúa como un átomo central que dispone de orbitales vacíos capaces de aceptar pares de electrones. Estos pares de electrones son precisamente donados por los grupos funcionales anteriormente mencionados [Navarro et al., 2016].

La formación de este enlace, puede estar acompañado por la dislocación de protones y dependiente en parte del grado de protonación de la pared que es determinado por el pH [Gupta et al., 2000].

- **Intercambio iónico**

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

- **Quelación**

La quelación implica inmovilizar un ion metálico con ligandos de bajo peso molecular para crear un complejo o una molécula químicamente estable. Algunos estudios revelan que la resistencia de los HPB y HPC de la madera a sales de MP, se debe al desarrollo de sideróforos o quelantes, entre los que se destacan el catecol y el ácido oxálico. El catecol moviliza el hierro hacia el interior de la célula fúngica [Reyes, 2007]. El ácido oxálico es capaz de inmovilizar iones metálicos para formar sales de oxalato en forma de cristales disminuyendo la solubilidad, por ende la disponibilidad de éstos en el medio.

- **Adsorción**

La adsorción de iones tiene lugar sobre materiales altamente porosos (adsorbente), como carbón activo, óxidos de hierro y aluminio, arcilla, materiales sintéticos y otros sustratos de origen biológico. En este

proceso la sustancia absorbida se une a la superficie del adsorbente mediante fuerzas físicas (fuerzas de Van der Waals) que son enlaces débiles lo que lo hace un proceso reversible por otro tipo de fuerzas químicas o enlaces covalentes [Patterson, 1992; Maldonado, 2007].

Este proceso de adsorción depende fuertemente del pH y cada metal tiene un pH óptimo para ser extraído. La temperatura, el tiempo de equilibrio, la concentración del metal y la presencia de otros iones en disolución son factores que influyen también en el proceso de adsorción [Patterson, 1991], pues en soluciones con más de un metal, se pueden generar tres tipos de comportamiento:

- a) Sinergismo: el efecto (adsorción) de la mezcla es mayor cuando los componentes están por individual.
- b) Antagonismo: el efecto de la mezcla es inferior al de cada uno de los metales.
- c) Sin interacción: cuando el efecto de la mezcla no es diferente al de los componentes por igual [Quingbiao et al., 2004].

Las interacciones permiten que los hongos sobrevivan a la toxicidad de los metales; basándose en la capacidad de aquellos para crecer bajo ciertas concentraciones de metales, se ha utilizado de manera arbitraria los términos *resistencia* y *tolerancia* [GDA, 1992 b,c].

Es por esto, que se ha propuesto que el término *resistencia* debería referirse a la sobrevivencia del organismo a la toxicidad, en este caso, de los metales, con base en mecanismos producidos como en respuesta directa según los tipos de especie del metal involucrado. Por otra parte se ha sugerido que el término *tolerancia* se aplique a la sobrevivencia del organismo a la toxicidad por metales, mediante las propiedades intrínsecas de un organismo o por modificación ambiental de la toxicidad [GDA, 1992].

Los mecanismos biológicos implicados en la sobrevivencia de los hongos a la toxicidad de los metales incluyen la precipitación extracelular, formación de complejos y cristalización, transformación de especies metálicas, biosorción de paredes celulares, pigmentos y polisacáridos extracelulares, transporte disminuido o impermeabilidad, expulsión, compartimentalización intracelular y precipitación y/o atrapamiento por ciertas moléculas.

3.2 Mecanismos de resistencia

La interacción de los hongos con los metales pesados ha desencadenado respuestas adaptativas, ya que presentan tolerancia a altas concentraciones a éstos y una adaptación fisiológica muy rápida; como parte de sus mecanismos se encuentran involucrados de tipo fisiológicos, genéticos y enzimáticos principalmente.

3.2.1 *Mecanismos fisiológicos y genéticos*

La supervivencia de los hongos depende de sus adaptaciones intrínsecas y por supuesto, de las propiedades fisicoquímicas del medio ambiente. Es posible que esta adaptación sea a través de mecanismos fisiológicos y genéticos, activados o inducidos por metales que controlan determinados eventos bioquímicos [Gutierrez et al., 2008].

En diversos grupos taxonómicos de hongos, los metales pesados son quelados por componentes extracelulares e intracelulares, de bajo peso molecular de carácter peptídico [Baldrian, 2002].

Uno de los sistemas de quelación o inmovilización de los metales, desarrollado por los basidiomicetes es el oxalato. La producción del ácido oxálico y otros agentes quelantes como ácidos orgánicos policarboxílicos y ácido nítrico, se da durante la degradación de la lignina [Reyes, 2007]. El ácido oxálico liga o inmoviliza iones metálicos solubles a compuestos de oxalato insolubles, lo que hace disminuir la biodisponibilidad de estos metales y aumentar la tolerancia.

3.2.2 *Mecanismos enzimáticos*

Algunos metales pesados son esenciales para el metabolismo fúngico, mientras que otros no tienen ningún papel biológico conocido. Los metales pesados esenciales y no esenciales cuando se encuentran en concentraciones superiores a las requeridas por la tasa metabólica se ocasiona toxicidad en estos mismos, pueden afectar a casi todos los aspectos del metabolismo, crecimiento y desarrollo de los hongos (por ejemplo la alteración de la pared celular que está compuesta principalmente de polisacáridos, como quitina, glucanas y quitosana, y de otros componentes como glicoproteínas y lípidos), dependiendo del grupo taxonómico, de la especiación y concentración del metal y de los diferentes factores fisicoquímicos del medio [GDA, 1989^a]. Los metales necesarios para el crecimiento fúngico incluyen el cobre, hierro, manganeso, molibdeno, zinc y níquel. Los metales no esenciales encontrados comúnmente incluyen Cr, Cd, Pb, Hg y Ag [Baldrian, 2002].

Metales como el Zn, Cu y Pb son conocidos como aceleradores en la producción de especies de oxígeno tóxicas, como radicales superóxidos sintetizados en su mayoría por las hidroxiperoxidasas. La GPx es un sistema antioxidante que cataliza la reducción de las hidroxiperoxidasas, protegiendo la célula del daño oxidativo por dichos radicales [Caregnato et al., 2008].

El interés científico por la interacción de los hongos con los metales pesados se derivó inicialmente de la toxicidad de dichos elementos en preparaciones fungicidas utilizadas para el control de patógenos de plantas y para preservar productos naturales y sintéticos [Horsfall, 1956; Ross, 1975]. También ha sido de importancia el estudio del efecto por metales tóxicos, metaloides, radionúclidos y compuestos organometálicos, lo que ha motivado el interés hacia los hongos debido a su ubicua y algunas veces dominante presencia en hábitats contaminados, la captación y traslocación de metales tóxicos y radionúclidos hacia los cuerpos fructíferos de los hongos, y la protección que los hongos micorrizicos brindan a las plantas contra los metales tóxicos [Brown y Hall, 1990].

Aunque se han encontrado hongos de diferentes grupos taxonómicos en ambientes altamente contaminados con MP, la diversidad de especies ha resultado disminuida [Babich y Stotzky, 1985; GDA, 1986^a]. El efecto tóxico de los metales sobre la población microbiana en ambientes naturales varía con la especiación y la concentración del metal, con los organismos presentes y con diversos factores ambientales [GDA y Griffiths, 1987]. Entre los factores del medio que pueden afectar la toxicidad de los metales hacia los microorganismos se encuentran: el pH, el potencial redox y los aniones y cationes inorgánicos.

El pH del medio puede influir en dos sentidos: modificando el estado fisiológico, y las actividades bioquímicas de los microorganismos y por tanto, sus reacciones hacia sustancias tóxicas y en la especiación del metal, lo que afecta su capacidad para unirse a la superficie celular. Cuando se incrementa el pH de una solución, dependiendo del tipo de metal, ésta puede formar diferentes especies hidroxiladas, siendo diferente a su vez la toxicidad de estas especies. A pH bajo, aumenta la concentración de H^+ , el cual puede competir con los MP por los sitios ionogénicos de los componentes celulares. La especiación de los ligandos orgánicos que pueden interactuar con los metales, y de este modo modificar su toxicidad, depende así mismo del pH del medio.

El potencial de oxidación-reducción del ambiente puede afectar la disponibilidad de los metales de manera directa, y de este modo sus valores de toxicidad. En un ambiente altamente reductor, los metales pueden combinarse con S^{2-} y tomar sales derivadas de sulfuros insolubles que los microorganismos captan. Este potencial también afecta la valencia del metal, por ejemplo, es más tóxico el Cr (VI) que el Cr (III) para el crecimiento micelial y para la germinación de las esporas de diferentes hongos [Babich et. al 1982].

Los iones y cationes inorgánicos del ambiente también influyen en la especiación del metal y así de su toxicidad. Los metales pesados forman complejos de coordinación con aniones inorgánicos (OH^- , Cl^-). La diferente especiación de los metales pesados que ocurre en presencia de concentraciones variables de los ligando aniónicos, puede ejercer diferentes efectos tóxicos en los organismos. En el caso de los cationes inorgánicos, pueden afectar la toxicidad de los metales como resultado de la competencia con las formas catiónicas de los MP por los sitios aniónicos de los componentes de la superficie celular.

4. REINO FUNGI

Muchas veces no le damos importancia al papel de los hongos en nuestra vida y no damos cuenta de que pueden ser nuestros aliados o enemigos [Biología de los hongos].

Los hongos no son ni plantas ni animales, sino que son un grupo de microorganismos pertenecientes al Dominio Eukaria, que pueden ser uni o pluricelulares, según Hawksworth [D.L. 2001] se estima que existen alrededor de 1.500.000 especies de hongos de las cuales solo se conoce aproximadamente el 5%, entre los que figuran levaduras, mohos y setas. Constituyen un amplio y fascinante grupo destacado por carecer de clorofila y tejidos vasculares especializados, y que a diferencia de las bacterias poseen núcleos celulares eucarióticos, y pueden tener un comportamiento saprofita, parasitario o simbiótico.

Por lo general, lo primero que se piensa al escuchar la palabra hongo es el típico champiñón (*Agaricus bisporis*) que se obtiene en el mercado, pero este tipo es solo una de las tantas especies que existen. La cantidad de formas, colores y tamaños que tienen los hongos es inmensa (Figura 5, 6,7,8). En el pasado, fueron considerados como parte del reino vegetal, posteriormente fueron clasificados por Whittaker (1969) en un quinto reino, el Reino Fungi.



Figura 7. *Trametes versicolor*.
Típico hongo en forma de “estante”, su cuerpo fructífero muerto puede persistir varios años. Ataca la madera produciendo pudrición blanca.



Figura 8. *Pycnoporus sanguine*
Es de color intenso, fácilmente reconocible. Al igual que *T. Versicolor* produce PB en la madera.

Entre las especies fúngicas conocidas podemos distinguir los hongos superiores y los hongos inferiores. Para fines prácticos se acostumbra llamar hongos superiores a aquellos que presentan fructificaciones macroscópicas vistosas y bien desarrolladas, aunque esto no sea rigurosamente exacto ni vale para todas las especies, como generalización es aceptable.



Figura 9. *Cookeina colensoi*.
Un Ascomycetes con apotecios estipitados



Figura 10. *Geastrum sp.*
Cuerpo fructífero tipo gastreroide, sus esporas son liberadas al viento a través de un pequeño orificio en su parte superior.

Análisis académicos permiten ubicar el origen de los hongos hace 1200 millones de años, adaptándose a todo tipo de eventos climáticos y condiciones adversas que les exigió gran capacidad de adaptación, generando además gran diversidad evolutiva [Stamets, 2002].

Hoy se considera como el organismo vivo que puede poseer mayor masa biótica como un solo ser individual. Por su capacidad de establecer complejas redes de micelio que se pueden extender por cientos de metros, se les ha denominado como *“El internet de la naturaleza”* [Stamets, 2008].

4.1. Características

Los organismos del reino fungi poseen además, características tanto del reino animal como del reino vegetal [Biology Online, 2007. Retrieved from Characteristics of the Fungi]. A continuación se hará mención de sus características más destacadas:

- **Inmovilidad:** Los hongos no poseen flagelos que les permitan el libre movimiento.
- **Poseen pared celular:** Son organismos eucariontes típicos, es decir, tienen núcleo, células bien definido, la pared es rígida, semejante a la de las células vegetales, pero en lugar de estar compuesta de celulosa, está compuesta de quitina, la misma sustancia que otorga a los insectos la dureza de sus exoesqueletos. Además, son células alargadas y que pueden contener varios núcleos, poseen vacuolas pero no cloroplastos, pues no hacen fotosíntesis.
- **Crecen como hifas:** El crecimiento de los hongos se produce en forma de hifas, que son estructuras cilíndricas y uniformes que pueden ir de los pocos micrómetros a los varios centímetros de longitud, pudiendo superponerse en un proceso de ramificación o bifurcación.
- **Son heterótrofos:** Necesitan carbohidratos complejos como fuente de energía al no realizar fotosíntesis ni de fijar carbono. Son quimiorganótrofos, ya que necesitan de compuestos orgánicos preformados como fuente de energía. La mayoría de los hongos toman sus nutrientes por absorción obteniéndolos como resultado de la degradación de compuestos complejos por las exoenzimas que liberan al medio.
- **No realizan fotosíntesis:** Como los hongos no poseen clorofila, no pueden realizar fotosíntesis ni elaborar su propio alimento a diferencia de las plantas (organismos autótrofos), que obtienen los nutrientes necesarios a través de ésta.

- Son descomponedores: Estos organismos son recicladores por excelencia, juegan un papel de vital importancia dentro del ecosistema, ya que al ser organismos descomponedores pueden transformar materia muerta. De este modo regresan al medio ambiente sustancias asimilables por otros seres vivos ayudando al flujo de nutrientes y energía a través de los ecosistemas naturales.
- La gran mayoría son aerobios estrictos porque necesitan oxígeno libre como aceptor de electrones para su crecimiento. Sin embargo, algunos pueden ser anaerobios facultativos, por lo que pueden utilizar otras moléculas como aceptores de electrones.
- Durante su ciclo de vida, los hongos pueden presentar dos tipos de reproducción: sexual y asexual. Algunos tienen la capacidad de reproducirse en estas dos formas, mientras que otros solo se limitan a una de ellas. Adicionalmente, en algunos se ha observado la parasexualidad.

4.2. Clasificación

La clasificación de los hongos se ha reelaborado a lo largo de la historia de la biología a medida que se desarrollan mejores técnicas de identificación, estos se distinguen principalmente por sus aparatos reproductores. La clasificación actual del reino se detalla a continuación [Fungi Austral, Guía de campo de los hongos más vistosos de Chile, 2017] (Figura 11):

- Hongos Basidiomicetos (Basidiomycota): Constituyen la familia de hongos más común. Se caracterizan por la presencia de órganos reproductores denominados basidios, en los que se almacenan las esporas. Al igual que los ascomicetos, pueden ser microscópicos, los macroscópicos forman setas.
- Hongos Ascomicetos (Ascomycota): Los ascomicetos presentan una estructura con forma de saco llamado asco o asca, los cuales contienen las esporas, las que se producen durante la reproducción asexual. Cabe destacar que hay especies de ascomicetos que se reproducen exclusivamente de manera asexual; esto se logra a través de conidios (esporas que se forman en los extremos de las hifas). Se conocen aproximadamente 30 mil especies.
- Hongos Zigomicetos (Zygomycota): Producen esporas sexuales conocidas como zigosporas, las cuales permanecen latente por un tiempo. Las células de sus hifas no tienen septos, es decir, paredes que separan a células individuales, por lo que pueden contener uno o más núcleos.

Quizás el zigomiceto mejor conocido sea el moho negro del pan. La reproducción asexual se da por medio de esporangióforos que generan esporas. Esta familia constituye la familia más pequeña del reino fungi, actualmente se reconocen poco más de 1050 especies [Introduction to the World of Fungi, 2017]

- Hongos Chytridiomicetos (Chytridiomycota): Aquellos hongos microscópicos y primitivos, generalmente acuáticos que se reproducen por esporas flageladas (zoosporas).



Figura 11. Clasificación de los hongos.

4.3. Morfología

Todos los hongos están constituidos por una unidad básica de crecimiento llamada *hifa*. Cada hifa es una célula o conjunto de células que poseen un crecimiento de elongación apical, usualmente de forma cilíndrica en hongos filamentosos, pero esférica en levaduriformes. En algunos casos, dentro de las hifas, se forman cavidades separadas por septos generados desde la membrana plasmática, los cuales en estado de crecimiento poseen poros que comunican estas cavidades generando un flujo de protoplasma hacia el punto de crecimiento. La hifa siempre estará delimitada o cubierta por una pared celular continua. Cuando la hifa se ramifica, pasa a formar un sistema hifal, al cual se le denomina *micelio* [Stamets, Paul, 1999]

El micelio es el cuerpo verdadero del hongo, que está compuesto por un conjunto de hifas (excepto las levaduras, puesto que son unicelulares) y delimitadas por una membrana de quitina y hemicelulosa, compuestos responsables de su rigidez. Por medio de las hifas, el hongo se alimenta, respira, crece y desarrolla las fructificaciones. A su vez, las fructificaciones se forman para propagar las esporas y crear nuevos micelios y así, colonizar nuevos territorios.

Si observamos al microscopio el sustrato en el que crecen (tierra, madera, etc.), encontraremos que está invadido por hifas (Figura 14 y 15). Lo que comúnmente se le llama “hongo”, son los cuerpos fructíferos de los mismos (como el árbol y la fruta, como referencia).



Figura 14. Micelio observado a simple vista sobre un sustrato.

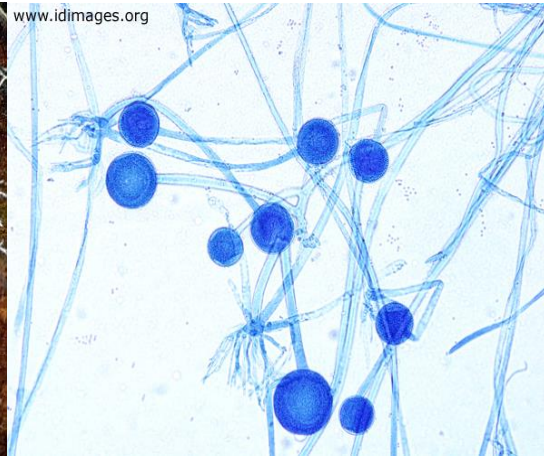


Figura 15. Micelio observado bajo microscopio.

Las estructuras encargadas de producir esporas no están distribuidas por todo el cuerpo fructífero, sino que se organizan en una superficie de éste (himenio) y la zona donde se encuentra el himenio sumado a otros elementos se denomina *himenóforo*. La presencia de esta estructura es una de las principales características a tener en cuenta a la hora de identificar un hongo.

Las células de los hongos microscópicos pueden presentarse en dos tipos morfológicos básicos, como levaduras (hongos levaduriformes; Figura 12 y 13) que son unicelulares, se unen entre sí y forman cadenas; o como hifas (hongos filamentosos) que son pluricelulares, las células de los hongos macroscópicos son todas como hifa, las que pueden estar separadas entre sí o conformadas en un conjunto con un citoplasma común. Una característica usada como un importante escalón evolutivo, es la presencia o ausencia de paredes transversales en las hifas llamadas *septos*.

Esta unidad estructural se presenta con un aspecto sifonado y con una pared de quitina y celulosa, las que pueden ser de dos maneras (apuntes Microbiología):

- a) Aseptadas: es decir, sin septos o tabiques que separen el citoplasma, por lo que toda la estructura es una masa citoplasmática con muchos núcleos llamado *cenocítico*. Este tipo de hifas es característico de hongos inferiores como *Mucor* y *Rhizopus*.

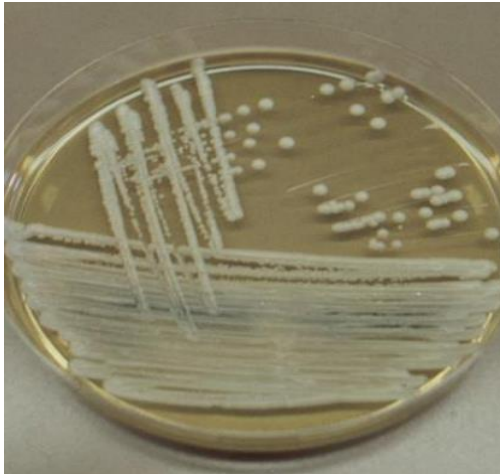


Figura 12. Levadura en placa Petri

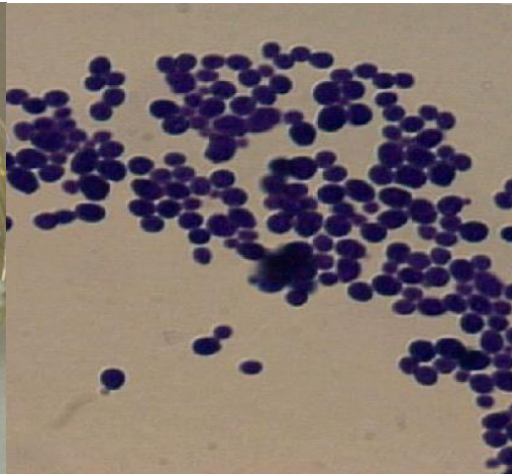
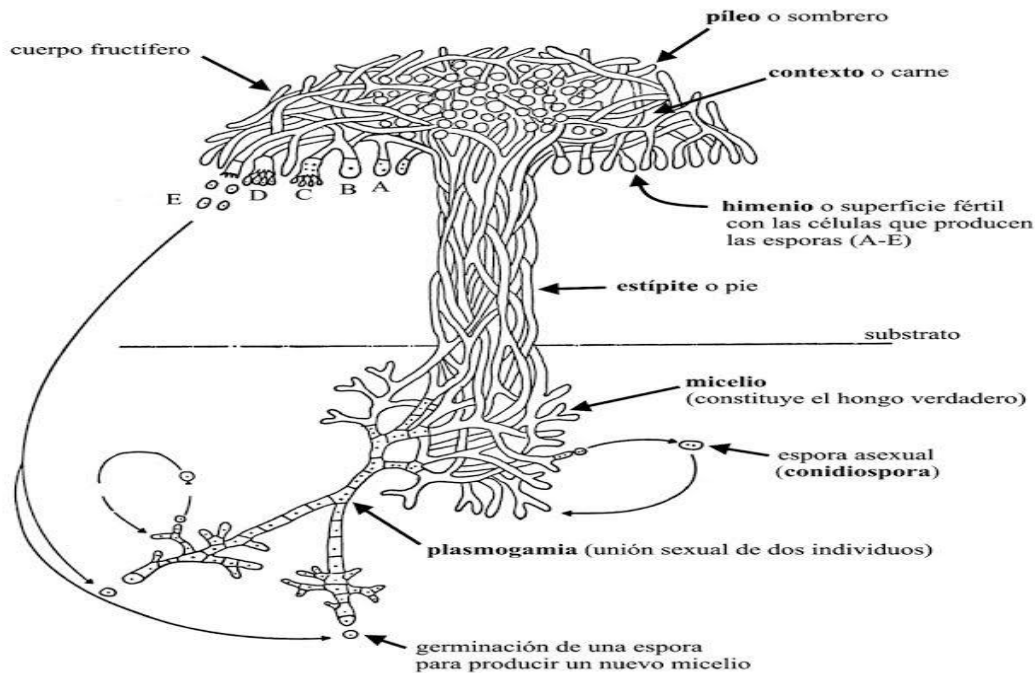


Figura 13. Levadura en microscopio

- b) Septadas: es decir, presentan un tabique en forma regular, pero que no separa completamente el citoplasma por poseer un poro central, a través del cual fluye el citoplasma; por lo que siguen siendo cenocíticos. Este tipo de hifas es característico de hongos superiores como *Saccharomices* y *Penicillium*. El tabique puede terminar de forma recta o formar una estructura como botón.

Los hongos filamentosos son aerobios, mientras que los levaduriformes son anaerobios facultativos. Son poco exigentes en cuanto a sus necesidades de temperatura y de pH, ya que la mayoría crece a un pH entre 2 y 9, y en un intervalo de temperatura de 10 a 40°C.

ESTRUCTURA DE UN HONGO



Gastón Guzmán

Figura 15. Esquema descriptivo de la estructura y forma de un Basidiomycete.

4.4. Nutrición

Otra de las tantas diferencias con las plantas y animales es que, las primeras se alimentan por medio de la fotosíntesis y los segundos por ingestión, en cambio los hongos se alimentan por absorción [Fungi Austral, Guía de campo de los hongos más vistosos de Chile, 2007]. Los hongos son descomponedores primarios, no pueden generar como las plantas su propio alimento, más bien, obtienen sus nutrientes por medio de un proceso conocido como *digestión extracelular*. Estos organismos secretan enzimas digestivas y posteriormente absorben moléculas orgánicas que dichas enzimas descompusieron proveniente de otras formas de vida vegetal o animal. La versatilidad de las enzimas es lo que contribuye al éxito ecológico que poseen [Revista La Lupa, Publicación semestral Año 4 Número 6 - Agosto 2014]. En relación en cómo lo hagan, se pueden clasificar en ["Reino Fungi", María Estela Raffino]:

- **Hongos saprófitos:** Se encuentran en todos los entornos terrestres y acuáticos, utilizando restos de organismos muertos (vegetales y animales) como sustrato para adquirir los nutrientes necesarios para vivir y devolver al suelo nutrientes inorgánicos que pueden ser tomados por las plantas. Los hongos son responsables del reciclaje de los componentes de las plantas muertas y de la descomposición de los restos de animales y

microorganismos (incluyéndose ellos mismos); esto también lo pueden realizar en conjunto con otros organismos, principalmente bacterias. Además son importantes ya que intervienen en los ciclos del carbono, nitrógeno, fósforo y potasio [Dix & Webster, 1995; Dighton, 2003; Morris & Robertson, 2005; Magan, 2007].

Estos hongos son los mejores descomponedores del material insoluble de las plantas, principalmente de la lignina. Como degradadores de la madera, estos hongos producen 3 tipos de pudrición: pudrición blanca (la que se detallará más adelante), pudrición café y pudrición blanda.

- Parásitos: Los hongos parásitos son los que crecen y viven sobre tejidos vivos, sin importar su origen. Gracias a la relación nutritiva con su hospedante, los hongos parásitos pueden ser biotróficos, cuando necesitan que las células que parasitan estén vivas, o necrótroficos, que matan las células del hospedero y luego se alimentan de sus componentes. Este tipo de hongos, con frecuencia causan daño sobre el hospedante. Cuando esto sucede reciben el nombre de *patógenos*.

Tanto los hongos parásitos como los saprófitos, obtienen su alimento a través de una digestión externa denominada lisotrófica. Es así como las sustancias hidrolizadas por las exoenzimas del hongo son absorbidas por las delgadas paredes de la hifa, nutriendo y alimentando el micelio.

- Micorrícicos: Se nutren mediante una relación simbiótica con un organismo vegetal, colonizando sus raíces e intercambiando con ellas diferentes nutrientes minerales y agua generados por el hongo a cambio de carbohidratos y vitaminas que el hongo es incapaz de sintetizar por su cuenta. Se cree que más del 95% de las plantas terrestres poseen alguna asociación micorrícica.
- Liquenizados: Se nutren a través de relaciones simbióticas producto de la unión de un hongo y un alga o cianobacteria, estableciendo una relación tan estrecha que pueden considerarse un mismo individuo. Se conocen como *Líquenes*.

4.5. Hábitat

Los hongos constituyen un grupo de organismos muy variados que se encuentran en prácticamente cualquier nicho ecológico, pero más abundantemente en el ecosistema terrestre que en el acuático, donde se disponga de carbono orgánico. Por esta razón, los hongos tienen una distribución mundial y prácticamente no existe lugar en donde no se hayan encontrado. Se pueden desarrollar en ecosistemas oscuros porque no dependen de la luz para su metabolismo, aunque está comprobado que la luz funciona como un agente externo que ayuda a regular su desarrollo y comportamiento.

El suelo, por la cantidad de microhabitats que posee es fácilmente colonizado por hongos que pueden estar activos metabólicamente o en forma de estructuras de resistencia. Sin embargo, la principal característica del suelo que lo hace tan atractivo para los hongos y otros organismos, es la disponibilidad de MO. Además, es en el suelo donde se completa el ciclo del carbono y los hongos intervienen en éste por medio de la descomposición de la MO acumulada.

Es de mencionar que, la capacidad de colonizar o degradar un sustrato depende de la batería enzimática que posea el hongo y de las condiciones ambientales presentes en el ambiente.

En los ambientes acuáticos, los hongos pueden vivir tanto en cuerpos de agua dulce como de agua salada pero en una menor biodiversidad que en el terrestre. Las especies estrictamente acuáticas son parásitas de algas y de invertebrados; aun así, su presencia en aguas marinas y salobres es baja.



Figura 14. *Zalerion maritimum*.
Hongo capaz de degradar plástico acumulado en el mar.

4.6. Reproducción

Estos organismos se reproducen de modo asexual y sexual, siempre a través de la producción de esporas (formas resistentes al medio ambiente que cuando se dan finalmente las condiciones óptimas, germinan y crean un nuevo ejemplar del hongo) [Katherine Torres Delgado, Tatiana Zuluaga Montoya, 2009].

La reproducción asexual también llamada somática, consiste en la mera multiplicación del organismo, en el cual predomina un origen mitótico. Ejemplo de esta modalidad es la fisión binaria y gemación (en el caso de las levaduras), fragmentación. Estos tipos de hongos pueden acceder a ciertas vías genéticas alternativas para la reproducción, como son la heterocariosis y la parasexualidad; lo que les permite cierta variación a pesar de no tener un ciclo mitótico.

Por otra parte, en la reproducción sexual, las hifas de los hongos individuales se encuentran y se unen a un proceso conocido como *plasmogamia*. El resultado de esa unión es una estructura llamada *gametangia*. Dentro de esa estructura, los núcleos de las células de los individuos se fusionan. Luego, mediante un proceso llamado *cariogamia*, se combina el ADN de los individuos, en este proceso se produce una espora que tiene el doble de la cantidad normal de cromosomas. Luego, esta espora se divide en mitades para crear dos esporas que finalmente se transforman en nuevas hifas [Octavio, 2013]. En la figura 16 se muestra el ciclo de reproducción de un Basidiomycete.

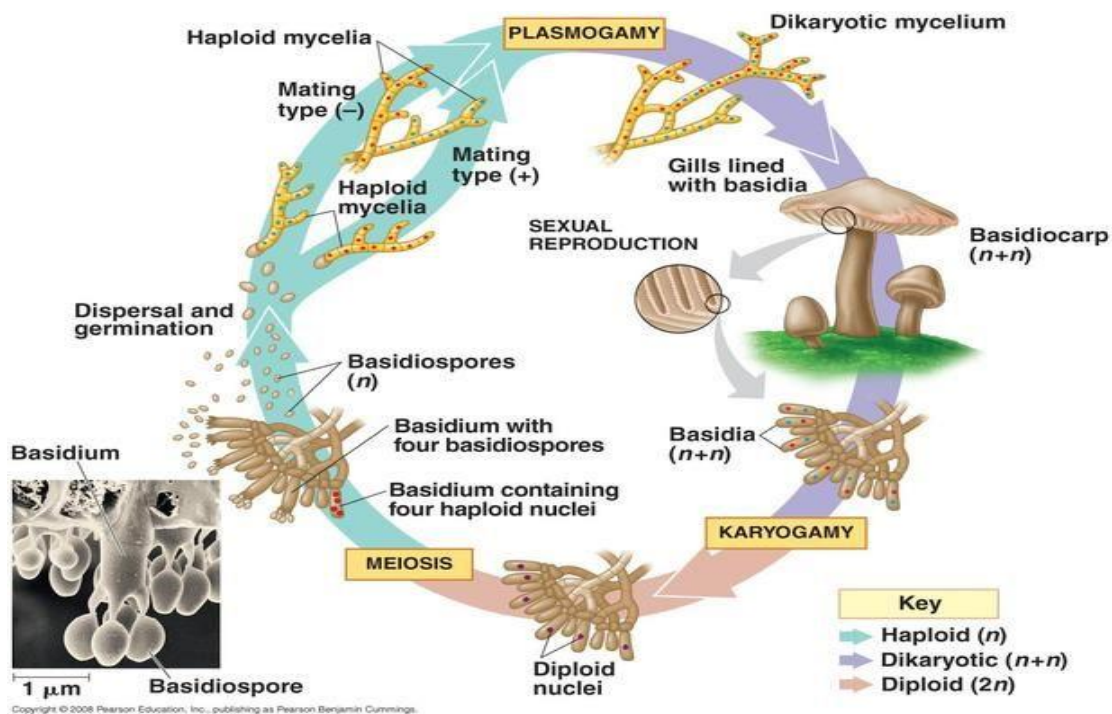


Figura 16. Esquema del ciclo de reproducción de un basidiomicete.

Existen dos tipos de esporas, dependiendo del origen de su formación: asexual y sexual.

- a) Esporas asexuales: Son el producto de una división mitótica de una única célula parental. Pueden ser:
 - Esporangiosporas: Derivan del clivaje de una estructura llamada *esporangio*, que nace de un esporangioforo. Estas esporas se producen dentro del esporangio y se libera cuando éste se rompe en la madurez; a este tipo de esporulación se le llama *Esporulación endógena*.
 - Conidios: Son propágulos de dispersión libre, inmóviles, deciduos generalmente, exógenos y por lo tanto no encerrados en un saco. Se desarrollan a partir de las células conidiógenas, las que a su vez están en el ápice de una hifa aérea fértil llamada *conidióforo*; o bien, por segmentación de una hifa vegetativa preexistente. Se conoce como *Esporulación exógena*.
- b) Esporas sexuales: La naturaleza de este proceso varía desde una simple fusión de hifas fértiles compatibles de dos diferentes cepas, a complejas uniones de estructuras diferenciadas en macho (-) o hembra (+), con la intervención de cuerpos fructíferos especiales que se llaman de acuerdo al grupo taxonómico al que pertenecen. Las más comunes son:
 - Oósporas: Derivan de un oogonio en hongos inferiores del grupo Oomycota.
 - Zigósporas: Derivan de un cigoto de los hongos inferiores Zigomycota.
 - Ascósporas: Derivan de un asca la que está contenida en un tejido llamado *ascomata* en hongos superiores del grupo Ascomycota.
 - Basidiósporas: Derivan de un basidio contenido en un tejido llamado *basidiocarpo*, en hongos del grupo Basidiomycetes.

4.7. Importancia del Reino Fungi

Debido a la abundancia y diversidad de los hongos, quienes desempeñan un papel ecológico muy importante en los ecosistemas. Que utilizan prácticamente cualquier material como sustrato, participan en el reciclaje de nutrientes y funcionan como recicladores y descomponedores de la MO. Es por esto, que se

considera que deben ser incluidos en los programas de conservación de biodiversidad y en planes de uso y manejo del suelo, donde muchas veces han sido ignorados [Hawksworth, 2001; Muller et al., 2004].

A raíz de lo anterior, en nuestro país desde el año 2013 entró en vigencia el Decreto 40 que aprueba el Reglamento del Sistema de Evaluación de Impacto Ambiental (RSEIA), donde se establece la OBLIGACIÓN de realizar Líneas de Bases de Hongos para los Estudios de Impacto Ambiental (EIA) [Museo Nacional de Historia Natural, Victor Ardiles, 2014].

Los hongos saprofitos tienen un gran impacto en los procesos geológicos alterando rocas y minerales, interviniendo en la acumulación de metales, en los ciclos de nutrientes e influenciando la proliferación de las comunidades de microorganismos que se desarrollan en ellos [Buford et al. 2003; Gadd, 2007]. De hecho, el papel de los hongos en los procesos de reciclaje de nutrientes, es de mayor importancia ecológica de lo que la mayoría de la gente piensa, ya que son potenciales biodegradadores y biorremediadores de compuestos contaminantes [Bial- Arístegui, 2002; Sinhg, 2006].

Sin embargo, pese a los enormes beneficios que han traído a la humanidad (la Penicilina por ejemplo), los hongos producen naturalmente antibióticos para matar o inhibir el crecimiento de bacterias, también son responsables de grandes pérdidas al dañar productos alimenticios e industriales, manufacturados o en procesos, y causar pérdidas en cultivos, cosechas y pos- cosechas. En los humanos, los hongos causan varios tipos de enfermedades como las micosis, las alergias, los micetismos (ingestión de hongos venenosos) y la micotoxicosis (ingestión de un alimento que contenga micotoxinas) [Moore- Landecker, 1996].

Aun así, hay muchas especies de hongos benéficas para el ser humano, en este ámbito se destacan los que son comestibles, además de las levaduras en los procesos de fermentación que juegan un rol vital en la transformación bioquímica de las sustancias.

4.8 Hongos de la podredumbre blanca

Entre los hongos pertenecientes a las divisiones basidiomicetos y ascomicetos, se encuentran los HPB, los cuales son considerados como los descomponedores más poderosos de la naturaleza [Adenipekun & Lawal, 20012]. Poseen un sistema enzimático que les permite degradar eficientemente todos los componentes de las paredes celulares de la madera, es decir, la hemicelulosa, celulosa y lignina [Quintero, 2001; Saldarriaga & Pineda, 2001]. La capacidad degradadora de estos hongos es posible por sus enzimas lignolíticas, principalmente lacasa, lignina peroxidasa y manganoso peroxidasa, quienes los hace útiles para la transformación de xenobióticos y su aprovechamiento en Micorremediación [Pointing 2001; Megan et al. 2010; Quintero Díaz 2011].

Su sistema lignolítico es extracelular, y eso les permite degradar sustratos sin tener que internalizarlos, permitiendo la oxidación de compuestos poco solubles en agua y aumentando su tolerancia a concentraciones de contaminantes relativamente altas. Este sistema extracelular es inducido por la limitación de nutrientes [Reddy & Mathew, 2001].

Las enzimas lignolíticas, rompen los enlaces carbono- carbono y carbono- oxígeno de la lignina o de los xenobióticos, dependiendo del caso, permitiendo la formación de estructuras más sencillas y de alguna manera menos contaminantes, modificando su solubilidad o estabilidad [Pointing, 2001].

La lignina se encuentra en la pared celular de la mayoría de los vegetales, formando una matriz compleja sobre las fibras de celulosa y hemicelulosa, confiriendo rigidez a la pared, protegiendo las células del ambiente externo y aportando hidrofobicidad. Su polimerización es al azar y su estructura es heterogénea e irregular, produciendo una macromolécula altamente compleja, amorfa e insoluble en agua [Boominathan & Reddy, 1992].

La lacasa, a parte de la degradación de la lignina, está involucrada en múltiples procesos del ciclo vital del hongo como el desarrollo de los cuerpos fructífero, pigmentación, patogenicidad y diferencia sexual [Leonowicz et al., 2011] y puede ser intracelular o extracelular.

Dentro de los requerimientos nutricionales de estos hongos, se encuentra el nitrógeno que se puede encontrar en sales de amonio y en otros compuestos como los aminoácidos; el carbono como la glucosa y celulosa; utilizan el azufre en forma de sulfatos y el fósforo presente en fosfolípidos de membrana, siendo su principal fuente el fosfato de potasio, igualmente otros elementos esenciales para el desarrollo de estos hongos son el manganeso y el cobre implicados en la actividad enzimática [Molinet & González, 2003].

La biorremediación usando hongos de la pudrición blanca es una técnica muy prometedora que está siendo estudiada, además de ser aceptada por organismos como la USEPA, por la Agencia Ambiental de Canadá y otras entidades reguladoras en todo el mundo [Iwamoto & Nasy, 2001] como tecnología de remediación viable.

4.9. *Pleurotus ostreatus*

Pleurotus ostreatus también conocido como hongo ostra, es un hongo de la PB perteneciente al grupo de los basidiomicetes, presenta un gran número de filamentos pluricelulares, los cuales forman su micelio. Su forma de reproducción puede darse de manera sexual y asexual. Una de sus principales características, es su sistema enzimático, ya que produce enzimas lignocelulósicas las cuales son utilizadas para la micorremediación. Estos hongos crecen sobre residuos agrícolas como la soya, bagazo de caña de azúcar o paja, además poseen un potencial alto para desarrollarse y mineralizar sobre restos industriales como té o sustratos no convencionales que posean hemicelulosa, lignina y celulosa [Upadhyay et al., 2006, pág. 3].

Pleurotus ostreatus se reconoce por la forma de su sombrero, aunque en realidad es muy variable tanto en la forma como en el color; por su crecimiento en grandes matas sobre madera y por las características laminillas decurrentes, así como también por la situación del pie, excéntrico o incluso lateral, común a casi todas las especies de *Pleurotus*.

4.9.1. Taxonomía [Sanchez y Royse, 2002]:

Reino: Fungi
División: Basidiomycotina
Clase: Homobasidiomycete
Subclase: Hymenomycete
Orden: Agaricales
Familia: Tricholomataceae
Género: *Pleurotus*
Especie: *ostreatus*

4.9.2. Morfología de *Pleurotus ostreatus*

Posee una superficie lisa que es convexa cuando la seta es joven, que luego se va aplanando de a poco, con sombrerillo redondeado. El diámetro puede variar de 5 a 15 cm, esto va en función de la edad del hongo. La coloración es mudable puede ir desde los tonos grises pardos o grises claros que a través del tiempo logra una coloración amarillenta, la cutícula es húmeda y fina, contiene una depresión en el lugar donde va el pie [Hermosilla y Sánchez, 2003, pág. 6].

Las láminas ubicadas en la zona inferior se extienden a lo largo del pie, pueden ser bifurcadas hacia éste, cuantiosas y finas, curvadas y estrechas, además de tener una coloración blancuzca o grisácea, en dichas láminas se establecen las

esporas, cuyo objetivo es la reproducción de la especie. El pie reducido es corto, apenas duro de color blanquecino, el crecimiento lo hace de manera aislada horizontal o a su vez pueden llegar a crecer en conjunto estableciendo estanterías laterales sobrepuestas en la parte lateral de los árboles [Hermosilla y Sánchez, 2003, pág. 6].



Figura 17. Morfología de *Pleurotus ostreatus*
Fuente: Jay, S.F (2010)

4.9.3. Mecanismo de biodegradación

Estos hongos son efectivos porque producen *lacasa*, una enzima extracelular, la que cataliza una reacción que degrada la lignina, para esto, la enzima requiere peróxido de hidrógeno, la cual el hongo produce [Frazar, C. 2000].

Principalmente se conocen tres mecanismos enzimáticos que los HPB utilizan para descomponer contaminantes ambientales, uno reductivo y dos de tipo oxidativo:

1. Sistema de degradación de la lignina: este sistema realiza ataques oxidativos a moléculas orgánicas a través de radicales libres que son formados por las enzimas lignolíticas peroxidasas.
2. Fase I del metabolismo: Es una unidad oxidativa donde entran en acción las enzimas citocromo P- 450 monooxigenasas.
3. Fase II del metabolismo: Es un conglomerado de enzimas que se encargan de que las reacciones de conjugación se apresuren provocando la disminución de contaminantes.

III PARTE EXPERIMENTAL

Este trabajo fue realizado en las dependencias el Laboratorio de Ecología del área de Microbiología de la Universidad Técnico Federico Santa María, sede José Miguel Carrera en Viña del mar.

1. AISLAMIENTO *PLEUROTUS OSTREATUS* DESDE UNA BANDEJA COMERCIAL

Los hongos necesitan nutrientes ricos en carbono, por esta razón se escogió el agar PDA debido a su alto contenido de dextrosa (fuente de carbono).

1.1. Materiales y equipos

- Bandeja comercial 250 gr de *Champiñón ostra*
- Placas Petri
- Bisturí
- Mechero Bunster
- Agar PDA
- Agua destilada
- Balanza analítica
- Autoclave
- Etanol
- Guantes de látex
- Papel absorbente
- Incubadora Memmert (27°C)

1.2. Procedimiento

- a) Se preparan 100 ml de agar PDA y esteriliza en autoclave a 121° C por alrededor de 20 minutos.
- b) Se distribuye el agar en las placas Petri (cuadriplicado) en condiciones asépticas.
- c) Se deja enfriar a temperatura ambiente.
- d) Con ayuda del bisturí, se realiza un corte en el champiñón ostra en su parte interior de aproximadamente 1x1 cm colocándolo lo más central posible en la placa Petri.
- e) Se sella y se incuba a 27°C.



Figura 18. Bandeja comercia Champiñón ostra



Figura 19. Aislamiento desde bandeja comercial a agar PDA en placa Petri.

2. AISLAMIENTO MICELIO *PLEUROTUS OSTREATUS*

Luego de realizar en aislamiento desde la bandeja comercial del champiñón ostra, se continúa con el aislamiento de su micelio, con los mismos materiales y procedimiento que para la obtención del inóculo primario.

3. PRUEBA PRELIMINAR

Se realiza una prueba preliminar para observar el comportamiento del micelio en el agar contaminado. Se trabajó con las siguientes concentraciones de Pb: 50, 150, 250, 350, 450 y 550 ppm, más el respectivo blanco o control. En quintuplicado.

3.1. Materiales y equipos

- 1000 ppm de Pb a partir de PbNO_3
- Agua destilada
- Etanol
- Papel absorbente
- Placas Petri (35)
- Mechero Bunsen
- Autoclave
- Incubadora Memmert
- Agar PDA
- Bisturí
- Parafilm
- Micelio *P. ostreatus*
- Regla 30 cm
- Shots de vidrio de 400 mL

3.2 Procedimiento

- a) Preparar 700 mL de agar PDA en shots y se autoclava a 121° C por 20 minutos.
- b) Antes de que se solidifique el agar, añadir a cada shot 5, 15, 25, 35, 45 y 55 mL de plomo a partir de PbNO_3 , exceptuando el shot del *blanco*.
- c) Distribuir el agar contaminado con plomo en placas Petri (triplicado), todo en condiciones asépticas.
- d) Dejar enfriar a temperatura ambiente.
- e) Inocular las cajas Petri con micelio de *Pleurotus ostreatus*.
- f) Incubar a 27° C y en ausencia de luz.
- g) Observar y medir el crecimiento del micelio.

4. PRUEBA FINAL

Luego de observar los resultados de la Prueba Preliminar, se decide modificar la concentraciones de Pb, siendo estas: 50, 150, 250, 350 y 400 ppm, más el respectivo blanco o control y se decide incubar por 8 días. Para la Prueba Final, se utilizan los mismos materiales y se sigue el mismo procedimiento que en la Prueba Preliminar.

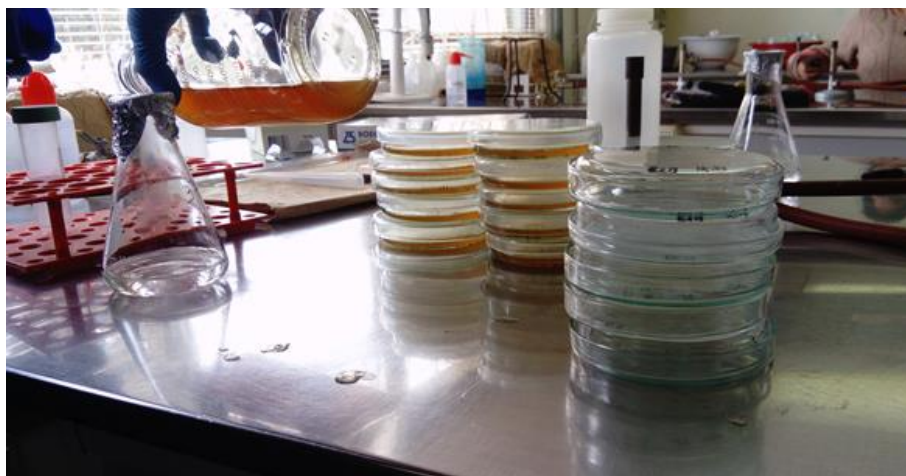


Figura 20. Preparación del medio agar PDA contaminado con diferentes concentraciones de plomo

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objetivo principal del presente trabajo fue evaluar la tolerancia *del Pleurotus ostreatus* in vitro en un medio agar PDA contaminado con diferentes concentraciones de plomo para probar su potencial biorremediador.

De acuerdo al artículo 7 del Reglamento del Sistema de Evaluación de Impacto Ambiental (RSEIA), Chile actualmente no posee una norma de calidad de suelos que haga posible establecer los valores de concentración para cualquier compuesto detectado en el suelo, que permitan catalogarlos como potencialmente contaminados o de calidad no aceptable. Pero sí nos guiamos por normas de países como los que se muestran en las Tablas 1, 2, 3 y 4 donde se detallan los valores de las normas medio ambientales de suelos de los países y Estados que se utilizaron para este estudio.

	Uso Agrícola	Uso Residencial
País	(mg Pb/kg suelo seco)	
Canadá	70	140

Tabla 1. La normativa canadiense proporciona valores de concentraciones para parámetros según los distintos escenarios de uso del suelo (Canadian Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health (CCME, 1999)).

	Valor objetivo	Valor de Intervención
País	(mg Pb/kg suelo seco)	
Holanda	85	530

Tabla 2. Esta norma considera dos criterios, el primero (valores Objetivos), considera los niveles en los cuales existe una calidad de suelo sostenibles (propiedades funcionales del suelo para humanos, plantas y animales). El segundo criterio (Valor de Intervención), es indicativo del nivel sobre el cual las propiedades funcionales del suelo se encuentran seriamente contaminadas (Dutch Target and Intervention Values for Soil Remediation (VROM, 2000)).

	Tipo de suelo		
	Arcilloso	Limoso	Arenoso
País	(mg Pb/kg suelo seco)		
Alemania	100	70	40

Tabla 3. Una particularidad de esta normativa es que considera valores diferentes según la textura predominante del suelo en cuestión. La finalidad de esta legislación es la de proteger o restaurar las funciones del suelo con una base sustentable permanente (Bundes-Bodenschutzgesetz (BBodSchG), 1998).

	VP	VI Uso Agrícola	VI Uso Residencial
País	(mg Pb/kg suelo seco)		
Estado de Sao Paulo, Brasil	72	180	300

Tabla 4. El primer parámetro (Valor de Prevención), se considera como la concentración de una sustancia (Pb en este caso) por encima de la cual pueden ocurrir alteraciones perjudiciales a la calidad del suelo. El segundo parámetro (Valor de Intervención), se considera como la concentración de una sustancia en el suelo por encima de la cual existe un escenario de exposición genérico Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB).

La liberación de metales pesados al medio ambiente ha ido incrementando continuamente como resultado de las actividades industriales y desarrollo tecnológico, siendo una amenaza significativa para el ecosistema y la salud publica debido a su toxicidad, acumulación en la cadena alimenticia y su presencia en la naturaleza. Por esto mismo, es importante desarrollar nuevos métodos para la remoción de estos contaminantes xenobióticos. Siendo la micorremediación una excelente alternativa descontaminante de ambientes afectados por plomo.

Por lo anterior, se decide realizar un análisis experimental donde se compruebe que un hongo es capaz de tolerar y sobrevivir a un contaminante tan recalcitrante en el ambiente como lo es el plomo. El término *tolerante* se emplea para referirse a aquellos microorganismos que poseen propiedades estructurales y bioquímicas intrínsecas que les permite sobrevivir en presencia de metales, por poseer paredes celulares impermeables, capacidad de excretarlo, o capacidad de producir modificaciones ambientales con efecto sobre la toxicidad del metal.

Este trabajo experimental con *Pleurotus ostreatus* mostró resultado efectivos, el hongo tiene la capacidad de adaptarse y tolerar in vitro un medio contaminado con diferentes concentraciones de plomo debido a las estructuras presentes en el mismo.

1. Resultados Prueba Preliminar

Al momento de realizar la Prueba Preliminar, y en relación a las concentraciones señaladas en las tablas 1, 2, 3, y 4 se seleccionaron las siguientes para hacer uso en el trabajo experimental:

Concentraciones de Pb en ppm						
0 (control)	50	150	250	350	450	550

Tabla 5. Concentraciones seleccionadas para la Prueba preliminar para el presente estudio.

Debido a temas de movilización interna en la universidad, no se pudo realizar un seguimiento diario del crecimiento del micelio, pero se observa que a los nueve

días ya se puede hacer un análisis y sacar conclusiones rápidas de éste, las necesarias para realizar modificaciones en cuanto a concentraciones tolerables del *Pleurotus ostreatus* al plomo y el tiempo estimado en desarrollarse el micelio. Modificaciones que serán aplicadas en la Prueba final.

2. Resultados Prueba Final

En la Tabla 6 se muestran las concentraciones finales para realizar esta prueba experimental:

Concentraciones de Pb en ppm					
0 (control)	50	150	250	350	400

Tabla 6. Concentraciones Prueba Final

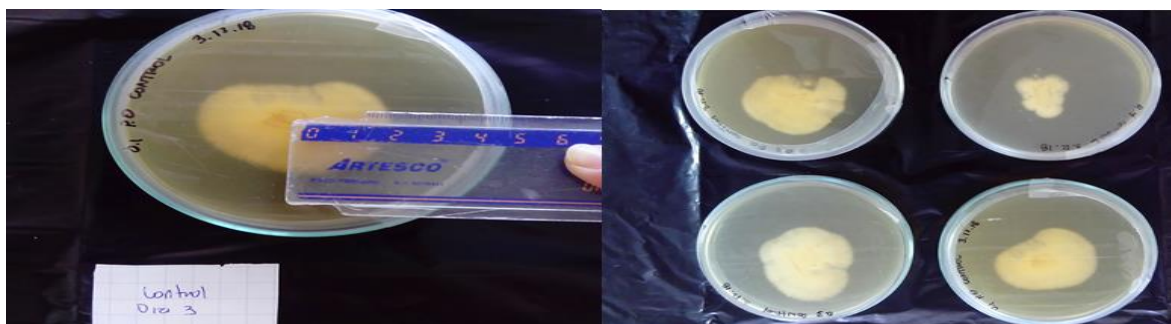


Figura 21. Desarrollo de micelio Control luego de 3 días.



Figura 24. Micelio desarrollado luego de 3 días a 50 pm.



Figura 24. Desarrollo del micelio luego de 4 días a 50 ppm

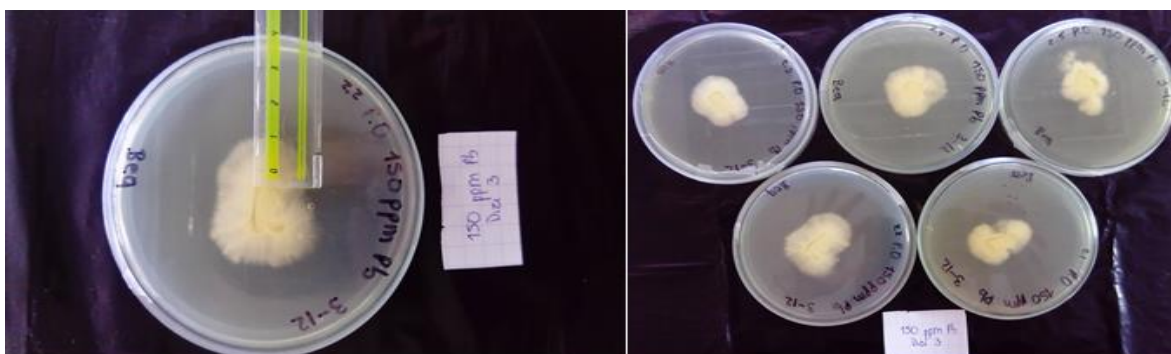


Figura 26. Micelio desarrollado luego de 3 días a 150 ppm

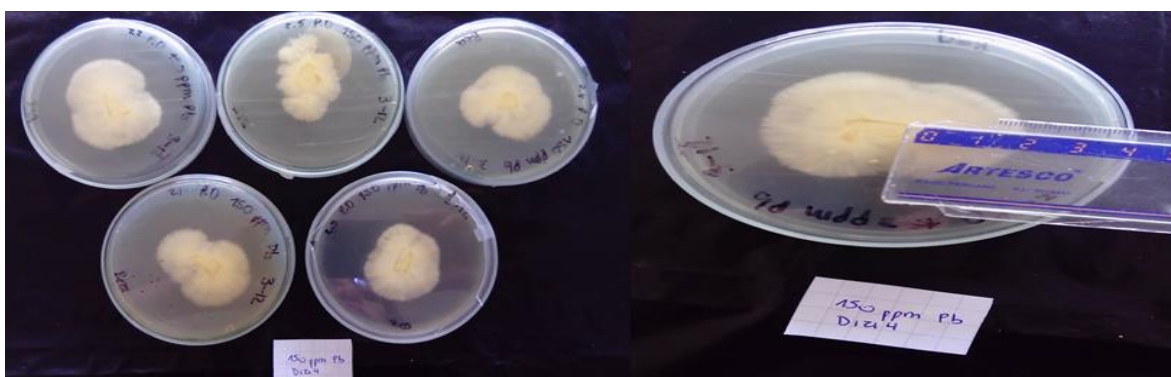


Figura 27. Micelio desarrollado luego de 4 días a 150 ppm



Figura 29. Micelio desarrollado luego de 3 días a 250 ppm

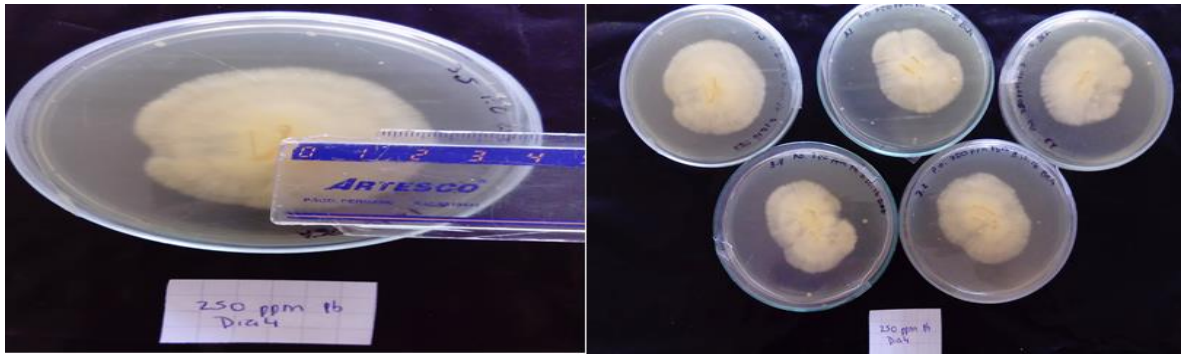


Figura 30. Micelio desarrollado luego de 4 días a 250 ppm.



Figura 32. Micelio desarrollado luego de 3 días a 350 ppm.

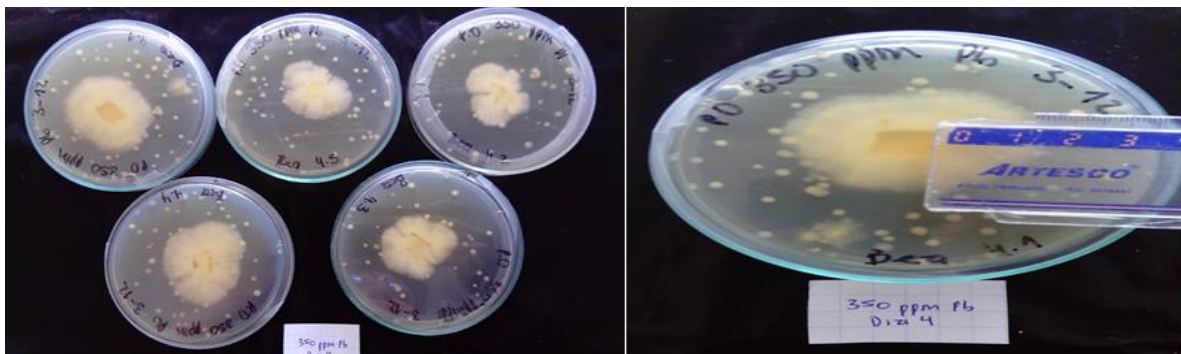


Figura 33. Micelio desarrollado luego de 4 días a 350 ppm.

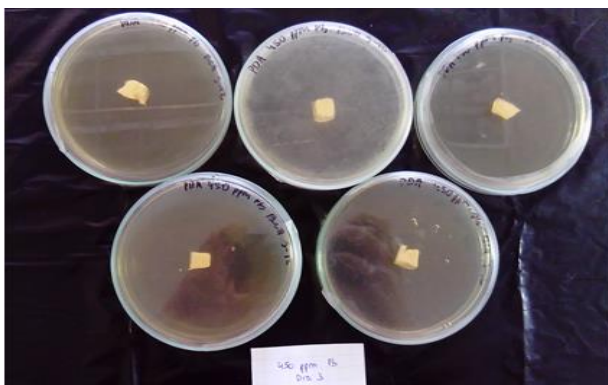


Figura 35. Desarrollo de micelio días a luego de 3 días a 450 ppm.

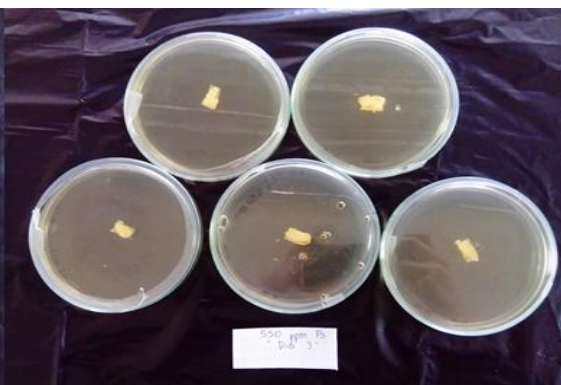


Figura 36. Desarrollo del micelio luego de 3 550 ppm.

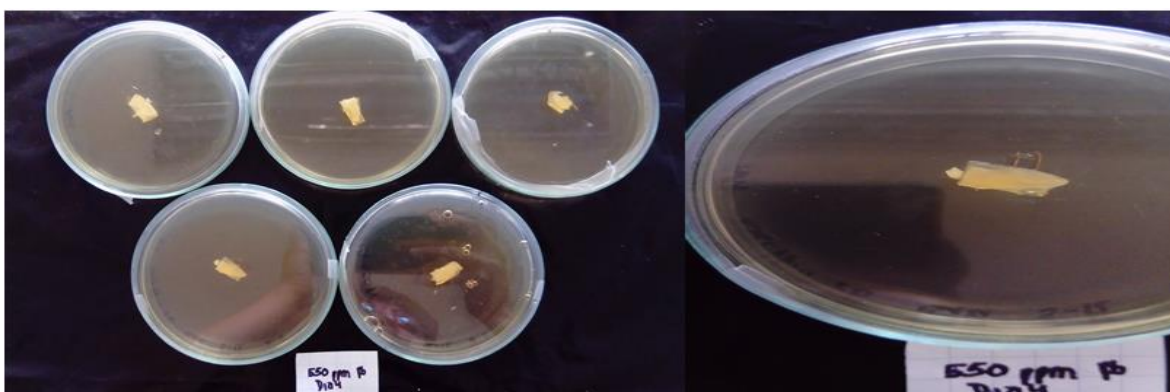


Figura 39. Desarrollo del micelio luego de 4 días a 550 ppm.

En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos luego de los primeros cuatro días en incubación a 27°C a las concentraciones determinadas.

Día	Concentración [ppm]	Crecimiento[cm]
1	Control	0,3
	50	0,1
	150	0
	250	0,1
	350	0
	400	0
2	Control	0,7
	50	0,5
	150	0,3
	250	0,6
	350	0,2
	400	0
3	Control	1,7
	50	1,2
	150	1,3
	250	1,6
	350	0,8
	400	0,3
4	Control	2,7
	50	1,7
	150	1,8
	250	2,3
	350	1,4
	400	0,9

Tabla 7. Resultados obtenidos luego de 4 días de inoculación en diferentes concentraciones a 27° C

V CONCLUSIÓN

Se realizaron dos pruebas, la Preliminar, para observar el comportamiento del micelio a las determinadas concentraciones y al tiempo de desarrollo, y la Final, donde se aplicaron modificaciones de acuerdo a lo observado en la Preliminar.

Se logró producir inóculo del hongo *Pleurotus ostreatus* en agar PDA suplementado con diferentes concentraciones de plomo, alcanzando una colonización total sobre algunas concentraciones al cabo de 9 días (según Prueba Preliminar).

El nivel de tolerancia al plomo de *Pleurotus ostreatus* se determinó por su capacidad de crecer y desarrollarse en medio agar PDA suplementado con diferentes concentraciones de este metal luego de 9 días de incubación.

Como lo arrojan los resultados de la Prueba Preliminar, *Pleurotus ostreatus* muestra inhibición a concentraciones sobre 450 ppm, por esta razón se decide para la Prueba Final, tomar como concentración máxima 400 ppm para comprobar hasta que concentración aproximada crece el micelio de *P.O.*

Ningún crecimiento presenta diferencia significativa con respecto al crecimiento Control. El efecto de la relación tiempo-concentración es directamente proporcional a la concentración de los metales.

La investigación arroja que, la descontaminación mediante hongos puede ser una solución para algunos de los problemas ambientales generados por los residuos tóxicos por causa de la actividad humana, pero está claro que para evitar un escenario aun peor que el actual, debe ocurrir un cambio profundo en la forma en que las industrias y la población gestionan y realizan sus actividades, y este cambio debe cumplir con los criterios de sostenibilidad emergente.

A través de este análisis experimental se demuestra la tolerancia del *Pleurotus ostreatus* a diferentes concentraciones de plomo.

VI RECOMENDACIONES

Antes de llevar a cabo una micorremediación, es necesario conocer las características físicas y químicas del medio, así como el origen del contaminante para poder seleccionar especies que se adapten a las condiciones ambientales del medio.

Los hongos requieren de un medio óptimo para poder desarrollarse por lo que se debe definir el más apropiado, que cumpla con las características necesarias para los hongos de la podredumbre blanca. Es necesario contar con un micelio joven del hongo para la realización de las pruebas.

El lugar donde se desarrolla la inoculación del *Pleurotus ostreatus* tiene que proveer de condiciones estériles adecuadas, el cual impida la contaminación de la cepa del hongo por agentes adversos.

Se debe mantener condiciones controladas durante todo el proceso, para obtener los resultados más eficaces posible.

Es importante comentar que el *Pleurotus ostreatus* demostró ser capaz de desarrollarse sobre las concentraciones propuestas, pero si éstas se ven incrementadas, posiblemente sea una causa para el fallo de un tratamiento de micorremediación.

Probar diferentes niveles de contaminación de plomo desde los 400 hasta los 450 ppm, para observar crecimiento del hongo y así determinar realmente su máximo tolerable.

Se recomienda seguir investigando al hongo *Pleurotus ostreatus*, ya que es una tecnología alternativa, y de fácil puesta en práctica para procesos de biorremediación.

VII BIBLIOGRAFÍA

- (1) Guy Carvajal Carranza, Revista Ambiental 1/2004. "Nuevas Líneas de Investigación de la Facultad de Ingeniería Ambiental".
- (2) Sherameti I, Varma A., Soil Biology: Soil Heavy Metals. New York, 2010.
- (3) ISPCH, Instituto de Salud Pública de Chile, <http://www.ispch.cl>
- (4) Concepto de contaminación, DeConceptos, <https://deconceptos.com>
- (5) Navarro Aviñó, J.P., Aguilar Alonso, I., López-Moya, J.R., Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. Ecosistemas [en línea] 2007, 16.
- (6) Buffle, J., Scott Altmann, R. Interpretation of Metal Complexation by heterogeneous Complexants en Aquatic Surface Chemistry: Chemical Processes at the Particle – Water Interface, 1987. Editado por W. Stumm. John Wiley & Sons.
- (7) Hursthouse, A.S., 2001. The Relevance of Speciation in the Remediation of Soils and Sediments Contaminated by Metallic Elements-An Overview and Examples from Central Scotland, UK. Journal of Environmental Monitoring 3(1): 49 -60.
- (8) Kalbitz, K. and Wennrich, R., 1998. Mobilization of heavy metals and arsenic in polluted wetland spills and its dependence on dissolved organic matter. The Science of the Total Environment 209: 27-39.
- (9) Kretzschmar, H. and Sticher, H., 1997. Transport of humic-coated iron oxide colloids in a sandy soil: influence of Ca²⁺ and trace metals. Environmental Science and Technology 31: 3497- 3504.
- (10) Catherine Soto, Sonia Gutiérrez, Alexandra Rey-León, Edwin González-Rojas, 2010. "Biotransformación de metales pesados presentes en lodos ribereños de los ríos Bogotá y Tunjuelo".
- (11) Biología de los hongos, Ediciones Uniandes- Universidad de los Andes, 2012, 5: 68-78; 8: 106-112.
- (12) Mejía Sandoval, Gregory, Aproximación teórica a la biosorción de metales pesados por medio de microorganismos. Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia [en línea] 2006, 1 (Enero-Junio).

- (13) Harper J. F. heavy metal pimps in plants. Government reports announcements & index, Issue 22. 15-24. 2000.
- (14) Knasmóuller S, et al. detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassays. Mutation research, 420(1-3):37-48, diciembre. 1998.
- (15) Hongos de Chile, <http://hongos.cl/>.
- (16) D.L. 2001. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. Mycological Research, 109: 1422- 1432.; Jugo S. Metabolism of toxic heavy metal in growing organism: a review. Environmental research, 13(1):36-46. 1977.
- (17) Romero R. A; Salgado O ; Marcano L. Impact social factors and heavy metal pollution on the incident of anencephaly at the eastern coast of lake Maracaibo, Venezuela. Trace Elements and Electrolytes, 1581:34-38. 1998.
- (18) Cortuelo Minguez, Luis M.; Marqués Gutiérrez, María Dolores. Los metales pesados en las aguas (I), su origen. Acción de agentes biológicos. Ingeniería Química. 31 (356) p. 263-266, mayo. 1999
- (19) Gutiérrez López, Julio. et al. Técnicas de biorrecuperación in situ en acuíferos contaminados por metales pesados. Instituto Geológico y Minero de España. Oficina de Proyectos de Valencia. 2000
- (20) Concepto de Reino Fungi, <https://concepto.de/reino-fungi/>
- (21) Reino Fungi; Características, Clasificación, Reproducción, <https://www.lifeder.com/caracteristicas-reino-fungi/>
- (22) Agency for Toxic Substance and Disease Registry. Toxicological Profile for Lead, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, GA. 2005
- (23) Biology Online. (2007, September 02). Retrieved from Characteristics of the Fungi: biology-online.org
- (24) Goyer RA, Clarkson WT. Toxic effects of metals. En: Klaassen CD editor. Casarett and Doull's Toxicology. The basic Science of poisons. New York: McGraw-Hill, 2001;811-67
- (25) Papanikolaou CN, Hatzidaki GE, Belivanis S, Tzanakakis GN, Tsatsakis MA. Lead toxicity update. A brief review. Med Sci Monit 2005;11: RA329-36.

- (26) Goyer RA, Clarksom WT. Toxic effects of metals. En: Klaassen CD editor. Casarett and Doull's Toxicology. The basic Science of poisons. New York: McGraw-Hill, 2001;811-67
- (27) Flora SJS, Mittal M, Mehta A. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. Indian J Med Res 2008;128: 501-23.
- (28) Insst, Metales: Propiedades químicas y toxicidad, <https://www.insst.es/InsstWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tomo2/63.pdf>
- (29) Castillo R. F, Biotecnología ambiental. Editorial Tébra, Madrid, 2005.
- (30) Katerine Torres Delgado, Tatiana Zuluaga Montoya, 2009. "Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos ".
- (31) BENAVIDEZ LOPER DE MESA, J. Biorremediación de suelos contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo. Nova. Colombia. No. 4, pp. 82-90. Junio 2006.
- (32) ICARITO, Reino Fungi, www.icarito.cl.
- (33) Fungi Austral, Guía de campo de los hongos más vistosos de Chile, Giuliana María Furci George-Nascimento, 2007.
- (34) Revista La Lupa, Publicación semestral Año 4 Número 6 - Agosto 2014 ISSN 1853-6743.
- (35) Stamets, Paul. undated. "Helping the Ecosystem through Mushroom Cultivation." Adapted from Stamets, P.1998. "Earth's Natural Internet". Whole Earth Magazine, Fall 1999.
- (36) Dix & Webster, 1995; Dighton, 2003; Morris & Robertson, 2005; Magan, 2007.
- (40) Octavio. (2013, May 08). Kerchak. Retrieved from La reproducción de los hongos: kerchak.com
- (41) Servicio Nacional del Patrimonio Cultural, "Linea de base Micologicas", Victor Ardiles, 2014.
- (42) Frazar, C. 2000. Biorremediation and phytytoremediation of pesticides contaminated sites. Prepai for US Enviromental Protection Agency, Office of Solid Waste and Emergency Response, Technology Innovation Office. Washington, D.C. <http://www.clu-in.org>