



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

“EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DEL HONGO *Pleurotus ostreatus*, EN LA BIODEGRADACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR CARBARYL”

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: PROYECTO INVESTIGACIÓN

Presentado para optar por el grado académico de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTOR: LUIS FERNANDO TOBAR BRAVO

TUTOR: Dr. IVÁN RAMOS SEVILLA

Riobamba – Ecuador

2018

© 2018, TOBAR BRAVO LUIS FERNANDO

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

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El Trabajo de Investigación: “EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DEL HONGO *Pleurotus ostreatus*, EN LA BIODEGRADACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR CARBARYL”, de responsabilidad del señor Luis Fernando Tobar Bravo ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

NOMBRE	FIRMA	FECHA
Dr. Iván Ramos	23/02/2018
DIRECTOR DE TRABAJO		
DE TITULACIÓN		
Ing. Rafaela Pacurucu	23/02/2018
MIEMBRO DEL TRIBUNAL		

Yo, LUIS FERNANDO TOBAR BRAVO, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales.

Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba, 23 de Febrero del 2018

LUIS FERNANDO TOBAR BRAVO

C.I. 060380441-0

Yo, Luis Fernando Tobar Bravo, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en el Trabajo de Titulación; y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

Luis Fernando Tobar Bravo

DEDICATORIA

Dedico mi Trabajo de Titulación primeramente a Dios quién me dió la fuerza para conseguir una de mis metas tan anheladas.

A mi padre Víctor quién desde el cielo me dió la fuerza, la sabiduría para emprender desde mi corazón todo lo que quiero y en este mundo me indicó a ser un señor de valor y que siempre hay que cumplir la palabra, pues siempre presentes sus palabras retroceder nunca, rendirse jamás.

A mis madres luchadoras Luly, Deisy y Elizabeth quienes me indicaron que ningún reto es fácil, porque hay que aprender a desafiar cualquier obstáculo de la vida para conseguir lo que uno quiere a pesar de las dificultades, agradecerles por indicarme a ser humilde y dar lo mejor de mí.

A mi esposa Mónica y a mis pequeñas Scarleth y Ada quienes me apoyaron incondicionalmente y a pesar de todos los problemas logramos conseguir una de nuestras metas por ustedes una grada más hacia adelante.

A mis hermanos Víctor y Danna quienes me inspiraron a seguir adelante porque forman parte de mi yo interior.

A mi familia Bravo Saquicaray quienes son mi felicidad total y siempre me dieron apoyo para ser un mejor ser humano y ahora mejor profesional.

Luis Tobar

AGRADECIMIENTO

Primeramente a Dios por ser quién puso en mi camino a personas de bien que hoy por hoy son lo mejor que tengo, mi familia Bravo Saquicaray y gracias a ellos soy ahora un profesional.

A mis madres quienes formaron grandes pilares de humildad y valor para seguir adelante frente a las adversidades y gracias a ellos lograr alcanzar un escalón más de tener mi título profesional.

A mi esposa quien estuvo siempre presente ayudándome moralmente para no decaer y seguir adelante por nuestras princesas.

A mis hermanos y amigos que durante esta etapa aportaron mucho en mantenerme firme con perseverancia y lograr obtener tan anhelada meta.

Agradezco a los Ingenieros de la Escuela de Ciencias Químicas, en especial a mis tutores al Doctor Iván Ramos y a la Ingeniera Rafaela Pacurucu quienes me ayudaron con sus conocimientos aportando con esta investigación para que se lleve a cabo, logrando formar un profesional más en esta prestigiosa institución.

Luis Tobar

TABLA DE CONTENIDOS

Contenido	Pp.
RESUMEN	xvii
ABSTRACT	xviii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	5
1. MARCO TEÓRICO.....	5
1.1. Plaguicidas	5
1.1.2. Clasificación de los Plaguicidas	5
<i>1.1.2.1. Según el destino de su aplicación pueden clasificarse en:</i>	<i>5</i>
<i>1.1.2.2. Por el tipo de organismo a controlar.....</i>	<i>5</i>
<i>1.1.2.3. De acuerdo con la persistencia.....</i>	<i>6</i>
<i>1.1.2.4. De acuerdo con la toxicidad</i>	<i>6</i>
<i>1.1.2.5. De acuerdo con el grupo químico o principio activo.....</i>	<i>7</i>
1.1.3. Plaguicidas más utilizados	8
<i>1.1.3.1. Organoclorados</i>	<i>8</i>
<i>1.1.3.2. Organofosforados</i>	<i>9</i>
<i>1.1.3.3. Carbamatos</i>	<i>10</i>
1.1.4. Contaminación ambiental por el uso de plaguicidas en el sector agrícola.....	11
1.1.5. Influencia del uso de plaguicidas.	12
1.1.6. Dinámica de plaguicidas en el suelo	12

1.1.6.1. Adsorción-Desorción	14
1.1.6.2. Lixiviación.....	14
1.1.6.3. Volatilización	15
1.1.6.4. Absorción por plantas.....	15
1.1.6.5. Degradación.....	15
1.1.6.6. Persistencia de plaguicidas.....	16
1.2. Carbaryl.....	16
1.2.1. Plagas que controla.....	16
1.2.2. Medidas de protección para el ambiente cuando se aplica Carbaryl.....	17
1.2.3. Biodegradación del Carbaryl en el ambiente	18
1.2.3.1. Rutas de la degradación de Carbaryl en plantas y animales.....	18
1.3. Biorremediación.....	19
1.3.1. Degradación de plaguicidas mediante hongos de la pudrición blanca de la madera....	19
1.3.1.1. <i>Pleurotus ostreatus</i>	20
1.3.1.1.1. Morfología de <i>Pleurotus ostreatus</i>	20
1.3.1.1.2. Mecanismos de biodegradación	21
CAPÍTULO II	23
2. METODOLOGÍA	23
2.1 Zona de estudio	23
2.1.1 Lugar de la investigación.....	23
2.2 Tipo de investigación.....	23
2.2.1 Identificación de variables e hipótesis.....	23
2.2.1.1 Variables.....	23

2.2.1.1.1 Variable dependiente.....	23
3.2.1.1.2 Variable independiente.....	23
2.2.1.2 Hipótesis.....	24
2.2.1.2.1 Hipótesis Alternante.....	24
2.2.1.2.2 Hipótesis Nula.....	24
2.2.2 Diseño experimental.....	24
2.2.2.1 Tipo de diseño	24
2.2.3 Esquema del proceso.....	26
2.2.3.1 Procedimientos.....	27
2.2.3.1.1. Muestreo del suelo contaminado.....	27
2.2.3.1.2. Análisis de la concentración de carbaryl en el suelo.....	27
2.2.3.1.3. Obtención de micelio de <i>Pleurotus ostreatus</i>	27
2.2.3.1.4. Colonización de <i>Pleurotus ostreatus</i> en semillas de trigo y avena	29
2.2.3.1.5. Preparación del suelo	32
2.2.3.1.6. Proceso de fructificación de <i>Pleurotus ostreatus</i>	33
2.2.3.1.7. Evaluación de la eficiencia de <i>Pleurotus ostreatus</i> en la biodegradación de carbaryl	34
CAPÍTULO III.....	35
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
3.1. Desarrollo de <i>Pleurotus ostreatus</i>	35
3.2. Desarrollo de <i>Pleurotus ostreatus</i> en los sustratos de crecimiento (Trigo y Avena)	36
3.3. Concentración inicial de carbaryl en las muestras de suelo	38
3.4. Desarrollo de <i>Pleurotus ostreatus</i> aplicado en el suelo contaminado.....	39
3.4.1. Tratamiento 1 – <i>Pleurotus ostreatus</i>	39

3.4.2. Tratamiento 2 - Pleurotus ostreatus + Avena	40
3.4.3. Tratamiento 3 - Pleurotus ostreatus + Trigo.....	42
3.5. Concentración de carbaryl posterior a la aplicación de los tratamientos en las muestras de suelo	43
3.5.1. Tratamiento 1 – Pleurotus ostreatus	43
3.5.2. Tratamiento 2 – Pleurotus ostreatus + Avena.....	44
3.5.3. Tratamiento 3 – Pleurotus ostreatus + Trigo	45
3.5.4. Comparación de las concentraciones medias de carbaryl obtenidas en los tratamientos	47
3.6. Porcentaje de degradación de los tratamientos	47
3.7. Análisis estadístico.....	49
3.6. Discusión.....	50
CONCLUSIONES	1
RECOMENDACIONES	2

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pp.
Figura 1-1. Insecticidas organoclorados	8
Figura 2-1. Estructura química del Paratión	9
Figura 3-1. Estructura química de los carbamatos	10
Figura 4-1. Cinética de la degradación de plaguicidas en el suelo	13
Figura 5-1. Proceso de adsorción y desorción de plaguicidas en el suelo	14
Figura 6-1. Morfología de <i>Pleurotus Ostreatus</i>	21

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	Pp.
Gráfico 1-2. Esquema del proceso	26
Gráfico 1-3. Concentración de carbaryl en las muestras de suelo.....	38
Gráfico 2-3. Concentraciones de carbaryl obtenidas terminada la fase experimental – Tratamiento 1 (Pleurotus ostreatus).....	44
Gráfico 3-3. Concentraciones de carbaryl obtenidas terminada la fase experimental – Tratamiento 2 (Pleurotus ostreatus + Avena)	45
Gráfico 4-3. Concentraciones de carbaryl obtenidas terminada la fase experimental – Tratamiento 3 (Pleurotus ostreatus + Trigo).....	46
Gráfico 5-3. Comparación de las concentraciones medias de los tratamientos implementados en el suelo	47
Gráfico 6-3. Comparación de los porcentajes de degradación medios de los tratamientos implementados en el suelo.	48

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

	Pp.
Fotografía 1-2. Preparación del medio de cultivo.....	28
Fotografía 2-2. Preparación de las cajas petri con el medio de cultivo	28
Fotografía 3-2. Inoculación de los medios de cultivo con <i>Pleurotus ostreatus</i>	29
Fotografía 4-2. Incubación de <i>Pleurotus ostreatus</i>	29
Fotografía 5-2. Auto clave de los sustratos de crecimiento	30
Fotografía 6-2. Inoculación de los sustratos de crecimientos con <i>Pleurotus ostreatus</i>	31
Fotografía 7-2. Incubación de los medios de crecimiento con <i>Pleurotus ostreatus</i>	31
Fotografía 8-2. Preparación del tratamiento 1 - <i>Pleurotus ostreatus</i>	32
Fotografía 9-2. Preparación del tratamiento 2 - <i>Pleurotus ostreatus</i> +Avena y el tratamiento 3 - <i>Pleurotus ostreatus</i> + Trigo	33
Fotografía 10-2. Primera etapa de desarrollo de <i>Pleurotus ostreatus</i>	33
Fotografía 1-3. Semillas rodeadas de micelio blanquecino.....	35
Fotografía 2-3. Desarrollo de <i>Pleurotus ostreatus</i> a los 10 días de inoculado en el medio de cultivo	36
Fotografía 3-3. Desarrollo de <i>Pleurotus ostreatus</i> a los 15 días de inoculado en el sustrato de crecimiento (Trigo)	37
Fotografía 4-3. Desarrollo de <i>Pleurotus ostreatus</i> a los 18 días de inoculado en el sustrato de crecimiento (Avena).....	37
Fotografía 5-3. Desarrollo de los primordios a los 12 días de la aplicación de <i>Pleurotus ostreatus</i> sin sustrato de crecimiento	39
Fotografía 6-3. Formación de los cuerpos fructíferos a los 9 días del desarrollo de los primordios	40

Fotografía 7-3. Desarrollo de los primordios a los 9 días de la aplicación de <i>Pleurotus ostreatus</i> con el sustrato de crecimiento (Avena).....	41
Fotografía 8-3. Formación de los cuerpos fructíferos a los siete días del desarrollo de los primordios.....	41
Fotografía 9-3. desarrollo de los primordios a los 8 días de la aplicación de <i>Pleurotus ostreatus</i> con el sustrato de crecimiento (trigo).....	42
Fotografía 10-3. Formación de los cuerpos fructíferos a los siete días del desarrollo de los primordios.....	43

ÍNDICE DE TABLAS

	Pp.
Tabla 1-1. Tipos de Plaguicidas	6
Tabla 2-1. Plaguicidas según su persistencia en el ambiente	6
Tabla 3-1. Clasificación de los plaguicidas según su toxicidad en DL50 (mg/kg)	7
Tabla 4-1. Clasificación de los plaguicidas según la familia química	7
Tabla 5-1. Plagas controladas con carbaryl.....	17
Tabla 6-1. Taxonomía del hongo <i>Pleurotus Ostreatus</i>	20
Tabla 1-2. Diseño Completamente al Azar.....	25
Tabla 1-3. Coeficiente de variación y media aritmética de las muestras de suelo.....	39
Tabla 2-3. Coeficiente de variación y media aritmética del primer tratamiento	43
Tabla 3-3. Coeficiente de variación y media aritmética del segundo tratamiento	45
Tabla 4-3. Coeficiente de variación y media aritmética del tercer tratamiento.....	46
Tabla 5-3. Porcentajes de degradación de los tratamientos.....	48
Tabla 6-3. Análisis de varianza de los porcentajes de degradación de los tratamientos	49
Tabla 7-3. Separación de medias de los tratamientos analizados.....	49

RESUMEN

Se evaluó la eficiencia del hongo *Pleurotus ostreatus*, en la biodegradación de suelos contaminados por el pesticida carbaryl. Se obtuvieron nueve muestras de suelo provenientes de la parroquia Tres Cerritos, cantón Pasaje, Provincia del Oro. La concentración del pesticida se determinó a través de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se inoculó el micelio de *Pleurotus ostreatus* en semillas de trigo y avena, se implementaron tres tratamientos, con tres repeticiones, para esto en recipientes de plástico se colocaron 3 kg del suelo contaminado, para el primer tratamiento se colocó el micelio del hongo directamente en el suelo disuelto en agua destilada, en el tratamiento 2 se colocaron 300 gramos de la avena colonizada con el micelio del hongo, para el tratamiento 3 se colocaron las semillas de trigo, alcanzada la etapa de fructificación del hongo, se determinó la concentración del carbaryl de cada uno de los tratamientos y se determinó el porcentaje de degradación, el diseño experimental implementado fue de tipo DCA (Diseño completamente al azar). La concentración media de carbaryl en el suelo es de 8108.6 mg/Kg, en función a la distribución de las muestras y el coeficiente de variación de 0.00047 la superficie de estudio presentó unos niveles de contaminación homogéneos, el tratamiento 3 (*Pleurotus ostreatus* + trigo) fue el que presentó la mayor capacidad de degradación de carbaryl, con un porcentaje de degradación del 59.06%, seguido del tratamiento 2 (*Pleurotus ostreatus* + avena) con el 55.95 %, el tratamiento 1 donde solo se usó solo *Pleurotus ostreatus* presentó el menor porcentaje de degradación con el 48.26 %. *Pleurotus ostreatus* demostró ser capaz de degradar el contaminante presente en el suelo, incrementando su eficiencia al complementarlo con un sustrato de crecimiento como el trigo, lo que le convierte en una alternativa viable para la recuperación de suelos contaminados.

Palabras clave: <BIOTECNOLOGÍA>, <BIORREMEDIACIÓN>, <CARBARYL (PESTICIDA)>, <MICELIO (*Pleurotus ostreatus*)>, <EFICIENCIA DE BIODEGRADACIÓN> < CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)> <INOCULACIÓN>

ABSTRACT

The efficiency of the *Pleurotus ostreatus* fungus was assessed in the biodegradation of contaminated soils by the pesticide carbaryl. Nine soil samples from Tres Cerritos Parish, Pasaje canton, Oro Province were obtained. The concentration of the pesticide was determined through high-resolution gas chromatography (HPLC), the *Pleurotus ostreatus* mycelium was inoculated in wheat and oats sedes, three treatment were implemented, with three repetitions, for this, 3 kg of contaminated soil were placed in plastic containers. For the first treatment, the mycelium of the fungus dissolved in distilled water was placed directly into the soil dissolved in distilled water. In the second treatment, 300 grams of colonizes oats with the mycelium of the fungus were placed. For the third treatment, the wheat seeds were placed. Having reached the fruiting stage of the fungus, it was determined the concentration of carbaryl of each of the treatments and the percentage of degradation. The experimental design implemented was a DCA (completely randomized design). The average concentration of carbaryl on the ground is 8108.6 mg/kg, depending on the distribution of the samples. The coefficient of variation is 0.00047. The surface of study presented some levels of homogeneous contamination. Treatment 3 (*Pleurotus ostreatus* + wheat) was the one that presented the greatest capacity of degradation of carbaryl with 59.06% of degradation followed by treatment 2 (*Pleurotus ostreatus* + oats) with 55.95%. Treatment 1, where only *Pleurotus ostreatus* was used, presented the lowest percentage of degradation with 48.26%. *Pleurotus ostreatus* proved to be capable of degrading the contaminant present in the soil, increasing its efficiency when it is complemented with a growing substrate such as wheat, which makes it a viable alternative for the remediation of contaminated soil

Keywords: <BIOTECHNOLOGY>, <BIOREMEDIATION>, <CARBARYL (PESTICIDE)>, <MYCELIUM (*Pleurotus Ostreatus*)>, < BIODEGRADATION EFFICIENCY > (HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) <INOCULATION>.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la humanidad a través del tiempo, principalmente desde la revolución industrial ha traído consigo efectos positivos y negativos, los cuales cada vez son más evidentes en la actualidad, esto se observa en como la calidad de vida de las personas a mejorado, así como sus expectativas de vida, siempre recordando los grandes contrastes que se presentan a nivel mundial donde por ejemplo el continente africano es uno de los más perjudicados cuando de desigualdad social se habla, miles de personas sufren de hambre y mueren por esta causa, a diferencia de Estados Unidos o China, países desarrollados donde la sobrepoblación ha hecho que se produzca una sobreexplotación de los recursos naturales, tanto el suelo como el agua se han visto afectados por la contaminación que se genera para producir los alimentos que satisfagan las necesidades de las personas.

En este contexto, se debe comprender lo importante que es el recurso suelo para el desarrollo de la vida, por esta razón, tomando en cuenta su extensión limitada, su vulnerabilidad y dificultad para recuperarse, además de los miles de años que requiere para formarse, se le ha considerado como un recurso natural no renovable (Silva y Correa, 2009). Este recurso es utilizado para múltiples fines como la agricultura, ganadería, pastizales, extracción de recursos minerales y de materia prima para la construcción. Además, el suelo como tal provee varios servicios ambientales entre los cuales se puede destacar que es el sustento de alimento para las plantas, almacena nutrientes, conserva la materia orgánica de los restos de animales y vegetales, además es el hábitat de una variedad de microorganismos importantes en las cadenas tróficas de los ecosistemas, estos y otros factores hacen del suelo un elemento esencial para el desarrollo de la vida (Dorronsoro, 2007).

Una de las actividades económicas que está acabando con el suelo debido al uso desproporcionado del mismo, es la agricultura, los productores hacen un uso intensivo de plaguicidas y fertilizantes ya que requieren producir más y en menor tiempo, tanto para la producción de alimentos como para la materia prima que forma parte de sustancias químicas, como es el caso de los biocombustibles, esto se ve reflejado en un ciclo sin fin donde se acaba con la fertilidad de los suelos, para luego transformar superficies naturales como bosques o páramos en nuevos suelos cultivables (Silva y Correa, 2009). Esto ha ocasionado una crisis agrícola, la cual ha dificultado la conservación de los ecosistemas afectando la salud de las comunidades rurales y de las personas de las áreas urbanas que consumen los alimentos, el buscar incrementar la productividad al corto plazo dejando de lado la sustentabilidad ecológica, ha dejado como consecuencia un envenenamiento y contaminación de los suelos, donde a nivel mundial el remedio termino siendo peor que la enfermedad (Puerto Rodríguez, et al., 2014).

Los plaguicidas se han transformado en uno de los principales contaminantes del ambiente, la contaminación ocasionada se da básicamente por la aplicación directa a los cultivos, un mal lavado de los tanques contenedores, residuos descargados o dispuestos en el suelo entre otros, al dispersarse en el ambiente se transforman en contaminantes de los sistemas bióticos y abióticos amenazando su estabilidad, por esta razón múltiples investigadores han mencionado que su uso en la agricultura debe ser reducido o prohibido (Sánchez, 2000). En el suelo, la aplicación de plaguicidas carbamatos ocasiona degradaciones microbianas (Puerto Rodríguez, et al., 2014), producen efectos perjudiciales y tóxicos como la erosión, pérdida de fertilidad, eutrofización, volatilidad, resistencia química, desertificación y compactación (Paredes, 2017), además, los productos de transformación son de gran relevancia para determinar los efectos sobre el ambiente como el etilentiourea metabolito que forma parte del mancozeb tiene efectos cancerígenos o el 1-Naftol el cual al ingresar al agua tiene un efecto cardiotoxico en especies ícticias (Narváez, et al., 2001).

Para la remediación de los suelos contaminados existen varias alternativas de tipo físico-químicas, que resultan ser costosas, además ciertas técnicas generan otros productos contaminantes resultado de los procesos implementados que de igual forma deben ser tratados, por esta razón en los últimos años se han desarrollado y aplicado técnicas de remediación sostenible, a las cuales se les ha denominado como tecnologías de biorremediación, las cuales son menos costosas y destructivas del medio en comparación con los tratamientos físicos y químicos (Quintero J. , 2011). La biorremediación aprovecha la capacidad de los microorganismos para degradar compuestos orgánicos, ya que estos ocupan los contaminantes como una fuente de energía en su metabolismo y por ende disminuye las concentraciones presentes en las áreas afectadas como pueden ser el suelo y agua; los organismos utilizados pueden ser naturales o mejorados genéticamente para ambientes específicos (Durán y Ladera, 2016).

La micorremediación es una manera de realizar biorremediación a partir del uso de hongos, la cual presenta algunas ventajas por sobre las bacterias, esto debido a que por su desarrollo micelial tienen la capacidad de penetrar de mejor manera los sustratos, además de abarcar un área más amplia (Torres, 2017). Los hongos de la pudrición blanca de la madera son de los más utilizados, por presentar características específicas que les permiten remediar los suelos contaminados, en especial los de la clase Basidiomicete conocidos por degradar la lignina de la madera, dentro de las principales ventajas tenemos que toleran considerables concentraciones de contaminantes, tienen la capacidad de desarrollarse en pH bajos y debido a que requieren de sustratos lignocelulósicos para crecer, es posible implementar en las áreas afectadas sustratos de bajo costo como el trigo y la avena, para mejorar el crecimiento, aumentando la degradación de contaminante (Quintero J. , 2011).

Pleurotus ostreatus es un hongo que dentro del grupo de los que conforman los hongos de la pudrición blanca, ha destacado por tener un mayor potencial para ser utilizado en técnicas de biorremediación, ya que formando parte del complejo multienzimático ligninolítico del hongo se encuentran enzimas como la lacasa, misma que forma parte de biodegradación de la lignina y de compuestos similares a la falta de lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa, tiene la capacidad de romper una gran variedad de enlaces, por lo tanto de degradar varios tipos de compuestos orgánicos; en función de lo antes expuesto la presente investigación pretende evaluar la eficiencia de *Pleurotus ostreatus* en la biodegradación de suelos contaminados con carbaryl, aplicado solo y con sustratos de crecimiento, siendo esta una alternativa de biorremediación que permita disminuir las concentraciones del contaminante en los suelos afectados (Torres, 2017).

Justificación de la investigación

Los problemas que representa la contaminación de los suelos por el excesivo uso de plaguicidas para el ambiente y la salud al corto y mediano plazo son de consideración, manifestándose principalmente con la disminución de su calidad, debido a que la acumulación de los contaminantes condiciona las características físicas, químicas y microbiológicas de los mismos, lo que a la postre reduce la fertilidad de los suelos y en vez de solucionar el problema con las plagas, este se incrementa por la resistencia que estas generan a los principios activos que tienen los plaguicidas. Revertir los niveles de contaminación registrados en los suelos por medios físicos o químicos resulta costoso, por lo que los agricultores optan por convertir áreas naturales en nuevas superficies cultivables, cuando los suelos que han estado utilizando pierden su productividad, esto ocasiona que se intensifique otro grave problema que debe soportar el ambiente que es el avance de la frontera agrícola.

Tanto el suelo como el agua son recursos básicos requeridos para el desarrollo de las poblaciones, por ende, su conservación y recuperación es importante para garantizar un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, por tal razón el presente trabajo investigativo se plantea como una alternativa ecológica cuyo objetivo es determinar la capacidad de degradación de carbaryl por parte de *Pleurotus ostreatus* en muestras de suelo provenientes de plantaciones de plátano y cacao de la zona agrícola ubicada en la parroquia Tres Cerritos, cantón Pasaje, provincia del Oro, lugar donde se hace un uso intensivo de este plaguicida, este hongo ha demostrado su eficiencia al momento de reducir las altas concentraciones de contaminantes, como otros tipos de plaguicidas, insecticidas, hidrocarburos, metales pesados, entre otros, que se han registrado tanto en el suelo

como en el agua, además se utilizaran co-sustratos de crecimiento como el trigo y la avena, mismos que por sus alto contenido nutricional servirán de alimento para el hongo, potenciando su crecimiento y la capacidad enzimática, por ende se obtendrá mayores porcentajes de degradación; los resultados obtenidos permitirán generar a futuro planes de biorremediación ambiental, ecológicos y económicamente sustentables.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

General:

Evaluar la eficiencia del hongo *Pleurotus ostreatus*, en la biodegradación de suelos contaminados por el pesticida carbaryl

Específicos:

- Cuantificar la concentración de carbaryl presente en las muestras de suelo
- Calcular la capacidad de degradación del carbaryl presente en suelo por acción de *Pleurotus ostreatus*.
- Comparar la eficiencia degradativa de *Pleurotus ostreatus* inoculado en dos sustratos de crecimiento (trigo y avena).

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Plaguicidas

De acuerdo a la definición planteada por la FAO un plaguicida es una sustancia o una conformación de sustancias que tienen como objetivo prevenir, suprimir o realizar el control de plagas de cualquier variedad, dentro de los cuales se incluyen a los vectores que propagan enfermedades a los personas y animales, también las sustancias químicas pueden ser empleadas en animales para controlar a los insectos que se encuentren en su ambiente u organismo, además se les aplica a las especies no deseadas (plantas o animales), que causan daños o pueden llegar a dificultar la producción, almacenaje, proceso o transporte de los alimentos (Ramírez y Lascaña, 2001, p. 68)

1.1.2. Clasificación de los Plaguicidas

A los plaguicidas se los ha clasificado tomando en consideración los siguientes criterios: según el destino de su aplicación, por el tipo de organismo a controlar, de acuerdo con la persistencia, de acuerdo con la toxicidad, de acuerdo con el grupo químico o principio activo, mismos que se describen a continuación:

1.1.2.1. Según el destino de su aplicación pueden clasificarse en:

- De uso fitosanitario: se utiliza para la sanidad y el control vegetal
- De uso ambiental: se usa para la limpieza de locales
- De uso en higiene personal: aplicación para el hombre
- De uso ganadero: se usa en los animales
- De uso doméstico: se utiliza en viviendas y locales
- De uso en la industria alimentaria: se utiliza en los tratamientos de maquinaria o productos (Bartual & Berenguer, 1980, p. 2).

1.1.2.2. Por el tipo de organismo a controlar

En la tabla 1-1 se describen los tipos de plaguicidas en función a los organismos que se va a controlar.

Tabla 1-1. Tipos de Plaguicidas

Tipo de Plaguicida	Controla
Insecticida	Insectos
Acaricida	Ácaros
Rodenticida	roedores
Fungicida	Hongos
Herbicida	Plantas indeseables
Rodenticida	roedores
Garrapaticida	Garrapatas
Nematicida	Nemátodos
Molusquicida	Moluscos

Fuente: Gonzalez, (2011), p. 36

1.1.2.3. De acuerdo con la persistencia

Se refiere al tiempo que el plaguicida persiste en el suelo manteniendo su actividad biológica (Tabla 2-1). La vida media del plaguicida se refiere al lapso de tiempo de degradación que transcurre para que el 50% del plaguicida este desactivado. Los resultados de la persistencia obedecerán a la biodisponibilidad y al nivel de toxicidad que tenga cada plaguicida (Ramírez y Lascaña, 2001, p. 69).

Tabla 2-1. Plaguicidas según su persistencia en el ambiente




Persistencia	Vida media	Ejemplos
No persistente	De 8 a 12 semanas	Malatión, diazinón, barilo, dimetrín
Moderadamente persistente	De 1 a 18 meses	Paratrión, lannate
Persistente	De varios meses a 20 años	DDT, aldrín, dieldrín
Permanentes	Indefinidamente	Elaborados a partir de mercurio, plomo arsénico

Fuente: Ramírez y Lascaña, (2001), p. 69

1.1.2.4. De acuerdo con la toxicidad

Según Ramírez y Lascaña, (2001), la toxicidad en los plaguicidas determina la peligrosidad de la sustancia, según la DL50 (dosis letal media) se tiene las distintas categorías tóxicas (Tabla 3-1).

Tabla 3-1. Clasificación de los plaguicidas según su toxicidad en DL50 (mg/kg)

Clase	Toxicidad	Ejemplos	Color de banda	pictograma
Clase IA	Peligrosidad: Extremadamente	Paratión, dieltrín,		
Clase IB	Peligrosidad: Alta	Eldrín, doclorvos		
Clase II	Peligrosidad: Moderada	DDT, clordano		
Clase III	Peligrosidad: Ligera	Malatión		
Clase IV	Peligrosidad: Sin peligro			

Fuente: Ramírez y Lascaña, (2001), p. 69

1.1.2.5. De acuerdo con el grupo químico o principio activo

En la tabla 4-1 se detallan los tipos de plaguicidas en función a su grupo químico o principio activo.

Tabla 4-1. Clasificación de los plaguicidas según la familia química

Familia química	Ejemplos
Organoclorados	DDT, aldrín, endosulfán, endrín
Derivados biperidilos	Cloromequat, diquat, paraquat
Derivados del ácido fenoxiacético	Dicloroprop, picram, silvex
Derivados cloronitrofenólicos	DNOC, dinoterb, dinocap
Piretroides	Cypermtrin, fenvalerato, permetrín
Derivados de triazinas	Atrazine, amteryn, desmetryn, simazine
Compuestos orgánicos del estaño	Cyhexatin, dowco, plictrán
Tiocarbamatos	Ditiocarbamato, mancozeb, maneb
Organofosforados	Bromophos, diclorvos, malatión

Carbamatos	Carbaryl, methomyl, propoxur
Compuestos de origen botánico	Rotenona, nicotina, aceite de canola
Compuestos inorgánicos	Arsénico pentóxido, obpa, fosfito de magnesio, cloruro de mercurio, arsenato de plomo, bromuro de metilo, antimonio, mercurio selenio, talio, fósforo blanco

Fuente: Ramírez y Lascaña (2001)

1.1.3. Plaguicidas más utilizados

1.1.3.1. Organoclorados

Los organoclorados (O-C) son compuestos aryl, heterocíclicos o carbocíclicos, poseen en su estructura química la de los hidrocarburos clorados aromáticos (Figura 1-1), con un peso molecular de 291 y 545 daltons, estos actúan como insecticidas de contacto y de ingestión.

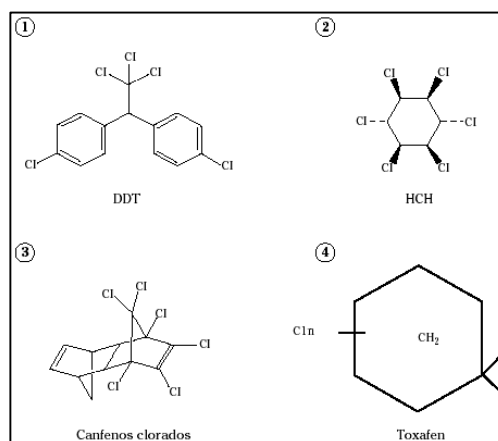


Figura 1-1. Insecticidas organoclorados

Fuente: Ferrer, (2003), p. 156

Tienen la capacidad de estabilizarse con la presencia de luz solar, aire, humedad, calor, y actividad microbiana por lo que son muy persistentes, causando contaminación en los suelos y aguas subterráneas, por lo que se han prohibido el uso de algunos de estos plaguicidas, por el momento solo son utilizados exclusivamente para la eliminación de vectores transmisores de enfermedades como el dengue y la malaria. La principal acción de estos plaguicidas es como insecticida, aunque también actúan como, herbicidas y fungicidas, mismos que han sido usados a lo largo de la historia, sin embargo, debido a la persistencia y bioacumulación su uso se va reduciendo en la

actualidad. Actúan en el sistema nervioso debido a la ingestión o al contacto, los plaguicidas organoclorados se concentran en el tejido adiposo y al nivel del sistema nervioso en donde ejecutan su acción toxica, asimismo impiden que las células respiren. (Ferrer, 2003, p. 158)

1.1.3.2. Organofosforados

Los organofosforados (O-P) son aquellas sustancias que son consideradas muy tóxicas, las cuales son solubles en grasas, estos plaguicidas pertenecen a diferentes familias como por ejemplo los fosfatos, fosforodiamidatos, fosfonatos, fosforoamidotoatoa, siendo algunas de ellas azufradas (Hayes, 1991, p. 733). Se han creado un aproximado de 50.000 productos identificados con este grupo, desde los años 40 (Figura 2-1).

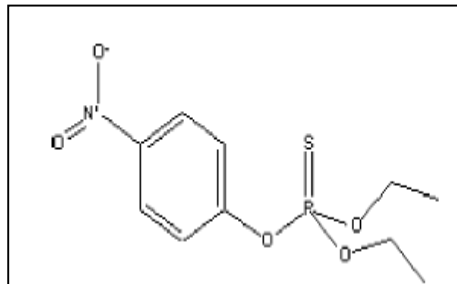


Figura 2-1. Estructura química del Paratión

Fuente: Ferrer, (2003), p. 156

Debido a que son liposolubles tienen la capacidad de transferir de manera fácil las barreras biológicas (piel, mucosas), además pueden ingresar en el sistema nervioso central con gran facilidad, este compuesto suele acumularse en el tejido adiposo produciendo una intoxicación retrasada debido a que tarda en liberar sus componentes, por otro lado, debido a su volatilidad es absorbido por el sistema respiratorio con gran facilidad. Estos plaguicidas son degradables, debido a que realizan reacciones de hidrólisis en un ambiente alcalino el cual se puede dar tanto en la tierra como en líquidos biológicos, resultando ser para el ambiente un compuesto moderadamente persistente, con una alta toxicidad.

1.1.3.3. Carbamatos

Los carbamatos son sustancias orgánicas de síntesis las cuales se derivaban del ácido carbámico (carbamato de N-Metilo) (Figura 3-1). Estos aparecieron a partir de la segunda guerra mundial, donde principalmente lo utilizaron en la actividad militar (gases neurotóxicos) y posteriormente tuvo un extenso uso en la agricultura.

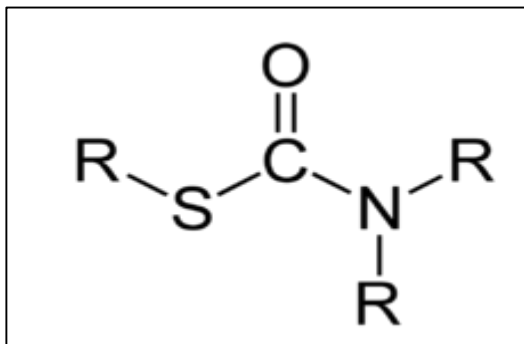


Figura 3-1. Estructura química de los carbamatos

Fuente: Ferrer, (2003), p. 156

Las principales propiedades que poseen los plaguicidas carbamatos son:

- En la estructura de los carbonados R1 y R2 (Figura 3-1) son H o metilo mismos que son aplicados como insecticidas, pero existen ciertos carbamatos que no ejecutan esta acción por lo que se los utiliza como fungicidas o herbicidas, tienen una mínima estabilidad química, poseen alta toxicidad, no se acumulan en los tejidos, esta es una propiedad ventajosa que tiene a diferencia de los plaguicidas organoclorados. Los carbamatos inhiben de forma reversible la enzima acetilcolinesterasa, formando parte de la sangre de manera inmediata y por lo tanto se distribuido a los tejidos (Ferrer, 2003, p. 157).
- Posee variadas reacciones de degradación: N-de metilación, sulfoxidación, hidroxilación, O-de alquilación. Algunas investigaciones determinaron que la hidroxilación alifática de las cadenas alquilo generan su trayecto preponderante de la biotransformación oxidativa. Los metabolitos de la última etapa entre los que se encuentra el dióxido de carbono (CO₂), pueden ser suprimidos por la respiración, orina y leche o integrarse en los tejidos de los organismos (Ferrer, 2003, p. 157).

- Los carbamatos herbicidas no tienen efectos tóxicos distintivos o característicos. Los ditiocarbamatos utilizados como fungicidas, poseen un metabolito común, el sulfuro de carbono o disulfuro de carbono (CS₂), las dosis de 2 a 20g representan peligro a excepción del aldicarb, los carbamatos herbicidas poseen una baja toxicidad (DL 50 4.000-10.000 mg/kg), las afectaciones son causas de síntomas digestivos no específicos y de dermatitis bullosa (Ferrer, 2003, p. 158).
- Las intoxicaciones provocadas por carbamatos fungicidas producen vómitos, náuseas, dolor abdominal y un ligero temblor de las manos y la lengua, también pueden presentarse irritación en la piel y las mucosas (Howland, et al., 1998, p. 1445).

1.1.4. Contaminación ambiental por el uso de plaguicidas en el sector agrícola.

Las acciones directas o indirectas de los plaguicidas pueden ocasionar diversos efectos, estos se agrupan en cuatro categorías:

- **Accidentes y descuidos.** Para este grupo se toma en consideración la eliminación de la flora acuática y de peces, debido a los vertidos accidentales, limpieza, lavados de envases y equipos de plaguicidas fuentes hídricas, al no ser realizados con la precaución correspondiente.
- **Modificación de la vida salvaje.** Esto es consecuencia del mal uso de un plaguicida específico, como por ejemplo los plaguicidas aplicados en el arroz y tratamientos de semillas.
- **Daños producidos por los residuos de plaguicidas:** Dentro de este grupo está los plaguicidas que son liposolubles, los cuales son capaces de degradarse paulatinamente, debido a su acumulación en los tejidos grasos del organismo, también están los hidrosolubles capaces de contaminar las aguas subterráneas.
- **Efectos indirectos.** Los tratamientos fitosanitarios alteran el medio ambiente, como por ejemplo debido a la utilización de productos para controlar malezas acuáticas, se produce una desoxigenación del agua, siendo un grave peligro para los peces, por otro lado, la eliminación de malas hierbas de la tierra origina transformaciones en la vida natural del medio. Los peligros que producidos van a depender de diversos parámetros como: las propiedades toxicológicas del plaguicida, las repeticiones y la dosis de aplicación, el tipo de formulación, método que se utiliza y el momento de la aplicación, la capacidad de movilización y la duración del plaguicida (Navarro y Barba, 1995, págs. 8-10)

1.1.5. Influencia del uso de plaguicidas.

Un factor que puede perjudicar de diferentes formas al ambiente, es el modo de aplicación del plaguicida, ya que algunos compuestos con una alta toxicidad pueden no manifestarse en el ambiente, siempre y cuando sean aplicados de manera correcta, de esta manera no se provoca ningún daño o efecto sobre los organismos que se encuentren en ese hábitat; existen también productos con una baja toxicidad, pero que son muy persistentes, estos podrán ocasionar efectos nocivos si estos son aplicados con intensidad o cuando se aplica en dosis extremadamente altas (Navarro y Barba, 1995, pág. 12).

La persistencia y bioaccesibilidad de los plaguicidas es influenciada por el tipo de formulación, los plaguicidas tipo cápsulas aumentan la persistencia en un compuesto, definiendo los efectos biológicos que se podrían ocasionar, el método de aplicación también influye en la extensión del cultivo, ya que no es lo mismo aplicar un tratamiento en áreas extensas de cultivos que aplicarlo a pequeñas parcelas, así como también los tratamientos aéreos son muy diferentes a los tratamientos terrestres (Navarro & Barba, 1995, pág. 12).

El momento de aplicación es muy esencial para eliminar plagas específicas, sin embargo, la utilización de ciertos plaguicidas se realiza en determinadas temporadas, esto puede generar un riesgo o peligro de consideración, para ciertas especies benéficas como las abejas. Así la dosis de aplicación es un factor importante ya que si se las aplica con demasiada frecuencia pueden ocasionar que las plagas se vuelvan resistentes al plaguicida (Navarro y Barba, 1995).

1.1.6. Dinámica de plaguicidas en el suelo

Una de las causas de las alteraciones producidas en el ambiente es el uso intensivo y sin control de los plaguicidas, razón por la cual algunos gobiernos promueven que se reduzcan su consumo, mediante la generación de normativas estrictas en la legislación. Los elementos que se ven más afectados por la aplicación de plaguicidas son: el suelo, la fauna, el agua, la flora y el ser humano. En los años 60 se manejaba la teoría de la capacidad auto depuradora de la tierra, mediante la dilución de contaminantes en aire, suelo y agua, pero actualmente esta teoría fue apartada debido a que la naturaleza posee ciertos mecanismos para poder conservar y concentrar estos plaguicidas, siendo esto una causa del desequilibrio y las transformaciones ecológicas (Navarro & Barba, 1995, pág. 14).

Para la aplicación de tratamientos con plaguicidas existen distintas formas, ciertos tratamientos se aplican en las partes aéreas de las plantas, donde el 50% del plaguicida se sitúa en el suelo, lo dificultoso de este método es hacer que la planta absorbe exclusivamente el tratamiento, esto

aplica en el caso de fungicidas, insecticidas y ciertos herbicidas. Mientras que en el caso de desinfectantes, nematicidas y otros herbicidas la aplicación se la realiza de forma directa en el suelo, obteniendo la acumulación de los productos en grandes cantidades en el suelo (Navarro & Barba, 1995, pág. 15).

Al incorporarse en el suelo el plaguicida, este ingresa a un ecosistema dinámico en el cual se moviliza y se degrada "in situ", desplazándose o manteniendo su estructura original, además puede presentar un cierto nivel de degradación en un determinado tiempo.

Se realizan tres etapas para la disipación del funguicida del suelo:

- Etapa 1. Denominada latencia, la cual es una etapa de corta duración, donde el plaguicida conserva una determinada concentración.
- Etapa 2. Donde se produce la disipación, esta es una fase rápida en relación con la total desaparición del plaguicida en el suelo.
- Etapa 3. Esta etapa se denomina de persistencia, es la fase más lenta y es expresada en unidades de tiempo como años, meses, días, horas (Figura 4-1) (Navarro & Barba, 1995, pág. 16).

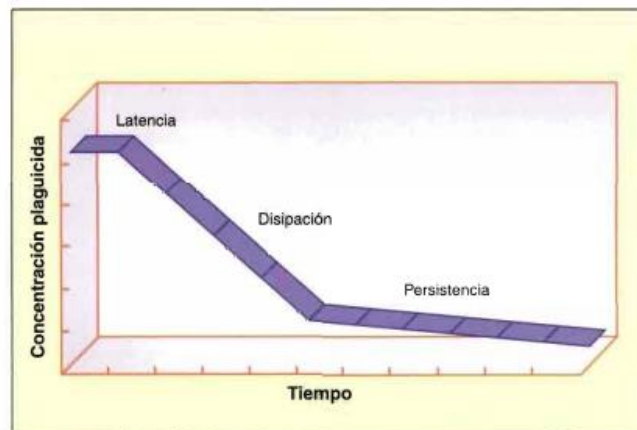


Figura 4-1. Cinética de la degradación de plaguicidas en el suelo

Fuente: Navarro y Barba, (1995), pág. 16

1.1.6.1. Adsorción-Desorción

Los parámetros que determina el cómo aplicar los plaguicidas para eliminar o impedir el crecimiento de plagas y su comportamiento como contaminante, son las características fisicoquímicas de la disolución del suelo, donde la proporción del producto en la disolución es importante e influye en su comportamiento. El proceso de adsorción se da debido a la atracción que hay entre una superficie sólida y una disolución o vapor, la cual se da como resultado de la interacción de fuerzas que proceden de la superficie del suelo (adsorbente) y de las moléculas o iones del plaguicida (adsorbato) (Figura 5-1) (Navarro & Barba, 1995, pág. 18).



Figura 5-1. Proceso de adsorción y desorción de plaguicidas en el suelo

Fuente: Navarro y Barba, 18995), pág. 18

La adsorción de los plaguicidas por parte del suelo tiene lugar por medio de la interacción entre las partículas del suelo y los plaguicidas, por tal razón la superficie específica y las propiedades fisicoquímicas de las partículas del suelo constituyen un parámetro a tener en cuenta, donde la fracción coloidal humus y arcillas cumple un rol primordial en el proceso. La adsorción de plaguicidas por coloides del suelo puede modificar su actividad, degradación y persistencia. Las moléculas que son adsorbidas cuando los coloides las retienen, aumenta su persistencia, conllevando a un riesgo de contaminación del suelo (Navarro & Barba, 1995, págs. 18-19)

1.1.6.2. Lixiviación

La acción de la lluvia o los sistemas de riego de aguas son los causantes de la lixiviación de plaguicidas en el suelo lo cual es muy frecuente, y para que se origine este proceso es esencial que el plaguicida tenga una solubilidad adecuada en el agua. La movilización del plaguicida puede ejecutarse ya sea asociado al agua o en disolución, en suspensión o emulsión. La extensión del

proceso va a depender de la naturaleza del plaguicida aplicado, más que todo de la capacidad de adsorción y de la estructura coloidal del suelo (Navarro & Barba, 1995, pág. 19).

1.1.6.3. Volatilización

La volatilización de los plaguicidas en el suelo y su esparcimiento en el aire viene a ser una vía normal para su supresión y dispersión. La volatilización potencial tiene una analogía directa con la presión de vapor, pero a pesar de aquello su efectividad está en función a la temperatura, el potencial hidrogeno, el contenido en agua, la naturaleza del plaguicida, la composición coloidal del suelo, la capacidad de adsorción del suelo y el porcentaje de plaguicida en el suelo (Navarro & Barba, 1995, pág. 20).

1.1.6.4. Absorción por plantas

Muestran algunos estudios que varios cultivos se han establecido en lugares tratados con anterioridad con plaguicidas han absorbido del suelo residuos de estos en proporciones variables, esto se da en función de las propiedades fisicoquímicas del compuesto que se han aplicado, las condiciones climatológicas, los tipos de suelo, el nivel de contaminación y la naturaleza del cultivo (Navarro & Barba, 1995, pág. 21).

1.1.6.5. Degradación

El proceso que se encarga de la disipación de los plaguicidas en el suelo es la degradación o también llamada descomposición, la cual puede darse a través de tres procesos conocidos como la degradación bioquímica, la degradación biológica y la foto descomposición.

La degradación bioquímica, poder diferenciar los procesos químicos de los biológicos, resulta dificultoso debido a que estos mantienen una estrecha relación, esto hace complicado establecer una independencia entre ambos procesos, para la degradación química se destruye los microorganismos del suelo empleando técnicas de esterilización o radiación lo que a la postre conlleva a que haya una variación de otros sistemas catalíticos que en el proceso de degradación terminan siendo influyentes. Es por ello por lo que ambos tipos pueden conjugarse y se conocen como degradación bioquímica (Navarro & Barba, 1995, pág. 21)

Las mutaciones que toleran los plaguicidas en el suelo pueden llegar a ser múltiples y dependerán no sólo de las características que puede poseer el plaguicida, sino de la textura del suelo, humedad, composición coloidal, tipo de microorganismos. La cantidad de metabolitos que aparecen durante el proceso degradativo son altos, esto en función a la cantidad de plaguicidas con características especiales que se estén usando; las estructuras nuevas que se llegan a unir lo hacen por medio de

polimerización hacia las sustancias húmicas del suelo, provocando la formación de otros compuestos de gran estabilidad (ligandos al suelo). (Navarro & Barba, 1995, pág. 22)

1.1.6.6. Persistencia de plaguicidas

La propensión de un compuesto a conservar sus parámetros físicos, químicos y moleculares se denomina como persistencia, además de conservar sus funciones en el medio en el cual se distribuye y traslada luego de ser aplicado en el ambiente. La persistencia de los plaguicidas para realizar un control de plagas es eficaz en los ciclos de los cultivos, por lo que tiene un gran impacto positivo en lo que se refiere al área agronómica, a pesar de esto, netamente desde la perspectiva ambiental es imprescindible tener conocimiento acerca de la degradación de este y así poder conocer y determinar cómo se acumula en el agua y el suelo (Navarro y Barba, 1995, pp. 23-24)

1.2. Carbaryl

El ingrediente activo del Carbaryl es: 1-Baftil – N – metilcarbamato 80.00%, la presentación es en un polvo que se puede diluir en agua, no se combina con la cal azufrada, plaguicidas líquidos, caldo bordelés, ni otros plaguicidas de reacción alcalina, este compuesto corresponde al grupo químico de los carbonatos, opera como ovicida en diversas especies de insectos, trabaja como un insecticida de acción por ingestión y contacto ya que tiene un efecto residual prolongado, por tal razón es altamente eficaz contra barrenadores, perforadores y gusanos defoliadores en un amplio número de cultivos. El producto mencionado no se acumula en la leche ni en tejidos grasos, por esto es de gran beneficio en lo que respecta al tema de control de plagas en forrajes. Debido al efecto de contacto que tiene, necesita abarcar de forma manera total todas las áreas que han sido tratadas.

1.2.1. Plagas que controla

En la tabla 5-1 se detallan las plagas que pueden ser controladas con Carbaryl.

Tabla 5-1. Plagas controladas con carbaryl

Plagas	Especies
Gusanos de las hojas	<i>Caligo sp. Opsiphanes tamarindi. Antichioris sp. Ceramidia sp.</i>
Gusanos del cogollo del cacao	<i>Sylepta progorata</i>
Gusanos del fruto	<i>Gymnandrosoma sp. Carmenta theobromae</i>
Perforador de la fruta	<i>Stenoma catenifer.</i>
Gusano tejedor	<i>Jocarasub curvalis</i>
Coquito colapsis	<i>Maeolapsis musae</i>
Gusano enrollador de la hoja	<i>Urbanus proteus</i>
Coquitos perforadores	<i>Diphaulaca sp. Andrector sp. Epitrix sp. Steirastoma sp. Brachyomus sp. Diabrotica sp.</i>
Polilla de la vainita	<i>Etiella zinkenella</i>
Saltahojas verde de la caraota	<i>Empoasca kraemeri</i>
Gusano del frijol	<i>Anticarsia germnata</i>
Mosquita del ovario	<i>Contarinia sorghicola</i>
Gusano del jojoto	<i>Heliothis sp.</i>
Gusano pelador	<i>Mocis sp.</i>

Fuente: Agrosiembra, (2016), p. 1

1.2.2. Medidas de protección para el ambiente cuando se aplica Carbaryl

Es fundamental impedir la contaminación de lagos, estanques y ríos, para esto se debe evitar el contacto con residuos o envases vacíos del producto, este es altamente toxico para las abejas, peces y crustáceos, no resulta ser toxico para los mamíferos. Una vez que el pesticida ya es correctamente aplicado, dentro del resultado está implícito que el proceso de disipación se manifiesta en un tiempo aproximado de 8 a 30 días y por ende se lo considera de una persistencia baja. El pesticida puede bio concentrarse en moluscos, algas, plantas acuáticas y peces, dentro de lo que son las plantas terrestres cuando éstas absorben transportan el plaguicida a varios tejidos antes de iniciar el metabolismo.

En cuanto al mecanismo de remoción en la atmósfera esta se da por la reacción con el radical hidroxilo (15 horas aproximadamente de vida media) y la precipitación con lluvia y polvo. A través de la hidrólisis es fundamental que exista un mecanismo de expulsión, debido a que el contaminante adquiere una vida media que puede ir de minutos a semanas todo ello en función de la temperatura, pH, y la concentración inicial.

1.2.3. Biodegradación del Carbaryl en el ambiente

Varios parámetros influyen en la degradación del Carbaryl, entre los que intervienen están la temperatura, pH, cantidad de materia orgánica, presencia o ausencia de oxígeno (Lartigues & Garrigues, 1995, p. 1250), en lo que respecta al pH en aguas y suelos si este es básico el proceso de degradación del Carbaryl es instantáneo a diferencia del pH neutro y ácido, varios estudios han corroborado que con un pH de 8.0 (alcalino) la degradación de Carbaryl la efectúan en 1.8 días y que a pH neutro, la vida promedio es de 10.5 días (Howard, 1991, p. 1), mientras que a un pH ácido el proceso se lleva a cabo a los 5.0 días. Larkin y Day (1986) determinaron que el promedio de vida de la degradación de Carbaryl en el agua, llegaría a manifestarse hasta un periodo de tiempo de cuatro años.

Otros estudios comprobaron que en suelos y aguas con temperatura de 20°C con pH alcalino el Carbaryl se hidroliza fácilmente a 1-naftol, metilamina y dióxido de carbono (Durkin & King, 2008, p. 1). Además, la degradación del Carbaryl en el suelo y agua, puede facilitarse por efecto de la luz o también conocido como foto degradación. Siendo el mayor producto del proceso antes mencionado el metabolito 1-naftol, que luego es foto oxidado a 2-hidroxi-1,4-nafto-quinona totalmente en medio básico (Montgomery, 2007, p. 620).

La cantidad de materia orgánica puede afectar la degradación de Carbaryl, varios estudios manifiestan que, en suelos franco-arenosos, la vida promedio del carbaryl es de aproximadamente 8 días, pero en una investigación de la degradación y biodisponibilidad de Carbaryl los suelos que mantenían un alto porcentaje de materia orgánica y además un largo historial de la aplicación, los resultados arrojaron que el Carbaryl era parcialmente persistente en el suelo (Ahmad, et al., 2004).

1.2.3.1. Rutas de la degradación de Carbaryl en plantas y animales

El Carbaryl es desnaturalizado por parte de factores bióticos entre ellos están: el metabolismo de plantas, microorganismos, animales, cabe mencionar que el metabolismo que se efectúa en plantas y animales es muy parecido, el proceso de metabolización empieza por hidrólisis y por la hidroxilación del anillo, generando con este procedimiento un gran número de metabolitos encontrando el 1-naftol, 5,6-dihidro-5,6-hidroxicarbaril, 1-naftil-N-hidroxi-metil-carbaril, 4-hidroxicarbaril, 5-hidroxicarbaril (Lima, et al., 2010, p. 245). Estos metabolitos soportan conjugaciones causando compuestos mercapturados, sulfatos y glucuronidos, los compuestos mencionados son solubles y que pueden ser eliminados por medio de la orina, dentro de los animales los niveles elevados de Carbaryl y el metabolito principal 1-naftol, se ubican en la sangre, cerebro, riñón, hígado (Koshlukova y Reed, 2014).

1.3. Biorremediación

La palabra biorremediación aparece a inicios de los años '80 procede de "remediation", estableciendo el manejo de tecnologías de remediación de principio biológico concretadas en determinar la capacidad microbiana para descomponer naturalmente ciertos contaminantes. La biorremediación se la puede mencionar como un proceso que tiene por objetivo primordial el detoxificar y descontaminar los componentes químicos por medio de la actividad de los seres vivos. Las técnicas de biodegradación, degradación o ruptura de contaminantes químicos se la conocen como biorremediación cuando en los procesos se incluyen microorganismos como hongos filamentosos, bacterias y levaduras, enzimas y plantas, de este proceso se generan compuestos que poseen una agresividad totalmente baja con el ambiente. (Gómez, 2004)

La biorremediación puede ser: ex situ o in situ, en el proceso ex situ el material contaminado es transportado hacia otro destino para que empiece el proceso de degradación, la biorremediación in situ se encarga en ejecutar el tratamiento del material contaminado en donde se haya producido el impacto ambiental sin necesidad de ser trasladado a un sitio diferente, el proceso se desarrolla en suelos profundos para que se pueda asimilar los productos generados de las descomposiciones de los contaminantes, estos pueden ser: petróleo, derivados. Fitosanitarios agrícolas, aceites y algunos compuestos orgánicos que son halogenados, además se incluye los procesos de descontaminación de áreas contaminadas con metales pesados. (Gómez, 2004)

1.3.1. Degradación de plaguicidas mediante hongos de la pudrición blanca de la madera

A partir de los años ochenta, se propuso el manejo de los hongos de la pudrición blanca como una opción a ser implementada en procesos de biorremediación en suelos que se han sido contaminados con plaguicidas, estos hongos corresponden a la clase *Basidiomycete* y se los conoce por la destreza que tienen para descomponer la lignina de la madera, capaces de soportar las elevadas concentraciones de los contaminantes y tienen una capacidad alta para desarrollarse a bajos valores de pH, otra característica de importancia que poseen es que debido a la ramificación de las hifas, estas ayudarían a alcanzar contaminantes ubicados en el suelo que están fuera del alcance de otros organismos, para un correcto crecimiento y desarrollo es imprescindible sustratos lignocelulósicos como carozo de maíz o paja de trigo, la viruta de madera, con el fin de ayudar a su crecimiento y por ende a la descomposición de los contaminantes (Barr & Steven, 1994, p. 85).

Estos son de fácil manipulación y cultivo además sus micelios se ahondan en forma de capas de sustratos, pese a que se precisa realizar una adaptación a los contaminantes y al medio para que logren descomponerlos, poseen la capacidad de beneficiarse de los plaguicidas como foco de

nutrientes (Coello , 2011, p. 17). Dentro de la naturaleza hallamos hongos que son útiles para la biodegradación de plaguicidas y son: *Pleurotus ostreatus*, *Cyathus bulleri*, *Fusarium sp*, *Aspergillus*, *Mucor circinelloides*, *Penicillium janthinellum* *Phanerochaete sordida*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma viridae* (Stamatiu, 2013, p. 32).

1.3.1.1. *Pleurotus ostreatus*

Denominado como el hongo ostra, *Pleurotus sp.* (Tabla 6-1), es un hongo saprófito muy comercializado y conocido a nivel mundial, el hongo forma parte del grupo denominado de la pudrición blanca de la madera, una de la principales características es su sistema enzimático, produce las enzimas lignocelulósicas las cuales son empleadas para la biorremediación, los hongos ostra crecen sobre residuos agrícolas como la soya, bagazo de caña de azúcar o paja, además también posee un potencial alto para desarrollarse y mineralizar sobre restos industriales como, bagazo de manzana, té o sustratos no convencionales que posean hemicelulosa, lignina y celulosa como las hojas secas de álamo (Upadhyay, et al., 2006, pág. 3)

Tabla 6-1. Taxonomía del hongo *Pleurotus Ostreatus*

Reino	<i>Fungi</i>
División	<i>Basidiomycotina</i>
Clase	<i>Homobacidiomicete</i>
Subclase	<i>Hymenomicete</i>
Orden	<i>Agaricales</i>
Familia	<i>Tricholomataceae</i>
Género	<i>Pleurotus</i>
Especie	<i>ostreatus</i>

Fuente: Sánchez y Royle, (2002)

1.3.1.1.1. Morfología de *Pleurotus ostreatus*

Posee una superficie lisa que es convexa cuando la seta es joven, que luego se va aplanando de a poco, además tiene un 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 y a través del tiempo logra una coloración amarillenta, la cutícula es húmeda y fina contiene una depresión en el lugar donde se inserta 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 el pie, 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, dichas esporas son de tamaño pequeño, oblongas, semi cilíndricas. 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 del tronco de los árboles (Figura 6-1). La carne de la seta tiene una coloración blanquecina, con un olor ligeramente fuerte, suave al inicio y después blanda (Hermosilla y Sánchez, 2003, p. 6).

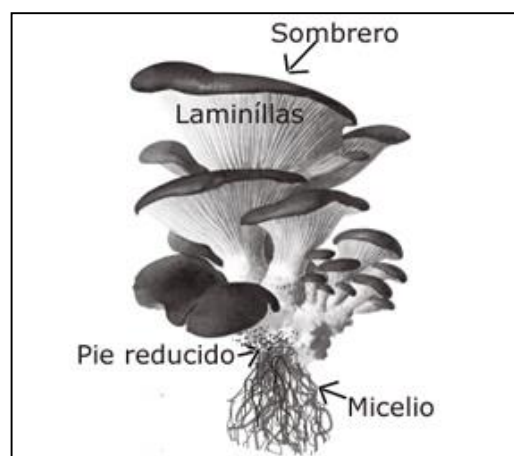


Figura 6-1. Morfología de Pleurotus Ostreatus

Fuente: Jay, s.f. (2010)

1.3.1.1.2. Mecanismos de biodegradación

Principalmente se conoce tres mecanismos enzimáticos que los hongos de la pudrición utilizan para descomponer contaminantes ambientales, uno reductivo y dos de tipo oxidativo:

- 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 ligninolíticas peroxidasas
- fase I del metabolismo: es una unidad oxidativa donde entran en acción las enzimas citocromo P-450 monooxigenasas
- 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.

Los tres mecanismos pueden descomponer o generar cambios en los contaminantes sin que haya la posibilidad de que sean utilizados como sustratos para su desarrollo es por eso por lo que el proceso de descomposición se lo hace por cometabolismo.

1.3.1.1.2.1. Enzimas que forman parte de los mecanismos de biodegradación

- **Lacasas.** Estas enzimas conforman el sistema enzimático ligninolítico generado por los hongos de la podredumbre blanca, este es un fenol oxidasa conformado por cobre que oxida anillos de lignina sin la presencia de Lip, tienen un conjunto N-glicosilato que posee en su arreglo dos monosacáridos: Manosa y N-acetilglucosamina, sumado a cadenas glicosídicas unidas al O y el N (Call y Mucke, 1997). Para un proceso efectivo el pH del medio puede encontrarse entre 3 a 7, con un promedio de 4.5 en el cual tendrá estabilidad con una temperatura de 37 °C durante 5 días como mínimo (Gayosso, et al., 2007).
- **Manganeso Peroxidasas.** Esta es una hemo proteína que promueve la oxidación de Mn^{+2} a Mn^{+3} en presencia de peróxido (H_2O_2), su potencial de oxidación es a fin solo para la absorción de electrones de conformación fenólica, el Mn^{+3} es quelado por muchos ácidos orgánicos como glicolato, que tiene la capacidad de oxidar múltiples compuestos fenólicos (Gayosso, 2004). Con altos porcentajes de manganeso se genera una desactivación de la enzima, por la producción de abundantes cantidades de peróxido de hidrógeno que paran los ciclos catalíticos de la enzima, perjudicando la cantidad de biomasa producida por el hongo y el desarrollo micelial del mismo (Gómez, et al., 2005).
- **Lignina peroxidasas.** Fue la primera enzima en revelarse y es parecida a otras peroxidasas, debido a que están conformadas por el grupo hemo férrico, su funcionamiento lo realiza a partir de la vía catalítica en la cual el Lip es oxidado por H_2O_2 , generando un intermediario al que le falta electrones, este regresa a su estado normal de quietud inicial por a través de oxidaciones que se dan posteriormente. Es una glicoproteína monomérica, la cual posee el 11% de carbohidratos, su pH eficiente está en el rango de 2.5 a 3, catalizando la oxidación de la lignina y compuestos que posean formaciones similares a esta, la lignina peroxidasa por síntesis endógena de peróxido tiene la capacidad de oxidar compuestos aromáticos no fenólicos y cliva cadenas laterales de aril propano y enlaces éter, interviniendo el anillo aromático e hidroxilándolo (Cullen, 1997).

CAPÍTULO II

2. METODOLOGÍA

2.1 Zona de estudio

La presente investigación se realizó en la parroquia Tres Cerritos, cantón Pasaje, Provincia del Oro

2.1.1 Lugar de la investigación

Las muestras de suelo fueron obtenidas de la plantación de plátano, se procesaron en el laboratorio de biotecnología de la Facultad de Ciencias, los análisis de la concentración de carbaryl en las muestras de suelo se realizó en el Centro de Soluciones Analíticas Integrales Centrocasal Cia. LTDA ubicado en la ciudad de Quito.

2.2 Tipo de investigación

El presente trabajo investigativo es de tipo experimental ya que se desconoce la capacidad de biodegradación del carbaryl por acción de *Pleurotus ostreatus* solo y con dos sustratos de crecimiento, explicativa ya que se analizó cómo la adición de un sustrato influye en la capacidad biodegradativa del hongo.

2.2.1 Identificación de variables e hipótesis

2.2.1.1 Variables

2.2.1.1.1 Variable dependiente

Concentración de carbaryl en el suelo

2.2.1.1.2 Variable independiente

Sustratos de Crecimiento (Avena y Trigo)

pH

humedad

Temperatura

2.2.1.2 Hipótesis

2.2.1.2.1 Hipótesis Alternante

El uso de un sustrato de crecimiento para *Pleurotus ostreatus* mejora el porcentaje de degradación del carbaryl presente en el suelo.

2.2.1.2.2 Hipótesis Nula

El uso de un sustrato de crecimiento para *Pleurotus ostreatus* no mejora el porcentaje de degradación del carbaryl presente en el suelo.

2.2.2 Diseño experimental

Se comparó la capacidad biodegradativa de *Pleurotus ostreatus* en tres formas de aplicación, en la primera se sembró el hongo directamente en el suelo, para el segundo se inoculó el micelio del hongo en un sustrato de crecimiento que fue trigo y para el tercero el sustrato fue la avena, posteriormente se procedió con la aplicación de los sustratos en el suelo contaminado, se determinó si existen diferencias significativas entre las capacidades biodegradativas de los tres tratamientos

2.2.2.1 Tipo de diseño

Se utilizó un diseño DCA (Diseño Completamente al Azar), el cual se analizó con un ANOVA, se implementó la prueba de Tukey para la separación de medias.

A continuación, se detalla la distribución del diseño experimental.

Diseño / (Tabla 1-2)

Tratamientos/ Nomenclatura = T

- T1 = *Pleurotus ostreatus*
- T2 = *Pleurotus ostreatus* + Avena
- T3 = *Pleurotus ostreatus* + Trigo

Repeticiones / Nomenclatura = r - Se implementaron tres repeticiones

Tabla 1-2. Diseño Completamente al Azar

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

Elaborado por: Tobar, L. (2018)

2.2.3 Esquema del proceso

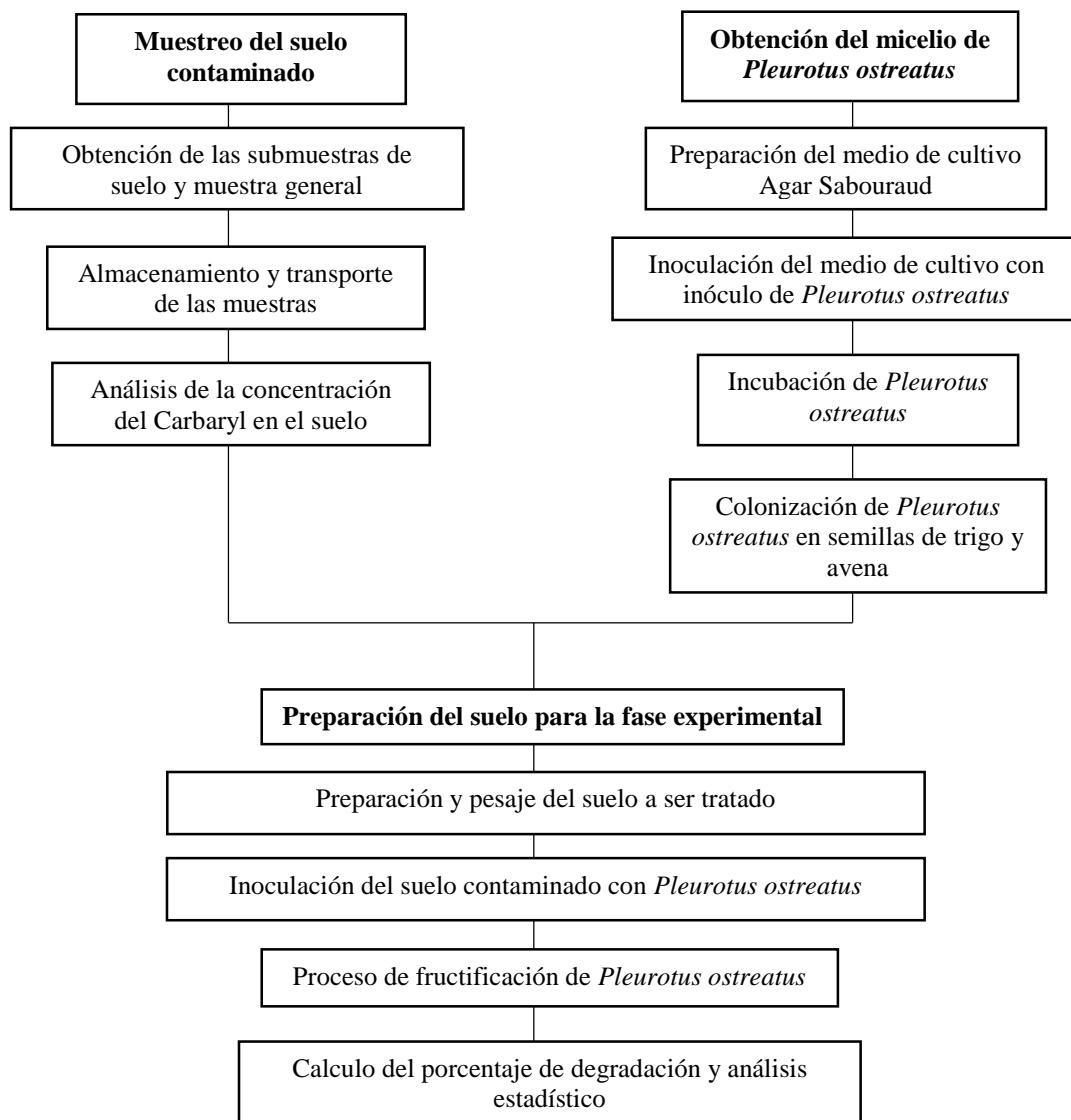


Gráfico 1-2. Esquema del proceso

Elaborado por: Tobar, L. (2018)

2.2.3.1 Procedimientos

2.2.3.1.1. Muestreo del suelo contaminado.

Para la toma de muestras de suelo en el terreno se utilizó la metodología zigzag, buscando abarcar toda la superficie del terreno, como lo recomienda el Instituto Nacional Autónomo de Investigación Agropecuaria, se tomaron un total de 20 submuestras ya que el área de estudio no era mayor a 5 hectáreas (INIAP, 2006).

La obtención de las submuestras se realizó con una pala de desfonde, para cada submuestra se recolectó aproximadamente 1 kg de suelo y se almacenaron en fundas plásticas, de las 20 submuestras se seleccionaron tres para el análisis inicial de la concentración de carbaryl, una al inicio, a la mitad y al final del terreno, estas se almacenaron en una funda ziploc para su transporte al laboratorio.

Con las submuestras restante se obtuvo una muestra general, para esto las submuestras se colocaron en un saco de yute y con la ayuda de la pala se procedió a homogenizar la misma, la muestra general se depositó en recipientes esterilizados para la posterior implementación de los tratamientos establecidos en la presente investigación.

2.2.3.1.2. Análisis de la concentración de carbaryl en el suelo.

El análisis de la concentración de carbaryl en el suelo, tanto de la muestra inicial como de los tratamientos, se realizó en los laboratorios del Centro de Soluciones Analíticas Integrales Centrocasal Cia. LTDA de la ciudad de Quito, en base a cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

2.2.3.1.3. Obtención de micelio de *Pleurotus ostreatus*

El micelio del hongo se obtuvo a partir de semillas de trigo colonizadas por *Pleurotus ostreatus*, según el procedimiento que se detalla a continuación:

Se preparó 150 mL de medio Agar Sabouraud Dextrosa de la casa comercial Difco™ (Fotografía 1-2).



Fotografía 1-2. Preparación del medio de cultivo

Elaborado por: Tobar, L. (2018)

El medio de cultivo y las cajas Petri (10) se esterilizaron en autoclave a 121 °C, durante 15 min bajo una presión de 15 psi. Posterior al proceso de auto clavado, se añadió 75 µL de bencilpenicilina (antibiótico) al medio de cultivo para evitar el crecimiento de bacterias, además, se reguló el pH del medio a 6.0, considerando que los valores recomendados para el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* están entre 4.0 y 7.0, siendo el rango más idóneo entre 5.0 y 6.5 (Sánchez y Royse, 2001) (Fotografía 2-2).



Fotografía 2-2. Preparación de las cajas petri con el medio de cultivo

Elaborado por: Tobar, L. (2018)

Una vez solidificado el medio de cultivo, cada caja Petri fue dividida en cuatro cuadrantes y en la parte central de cada cuadrante se inoculó una semilla de trigo colonizada por micelio de

Pleurotus ostreatus (Fotografía 3-2), finalmente las cajas Petri se incubaron a 28 °C por aproximadamente 10 días (Fotografía 4-2) (Rojas, et al., 2010).



Fotografía 3-2. Inoculación de los medios de cultivo con *Pleurotus ostreatus*

Elaborado por: Tobar, L. (2018)



Fotografía 4-2. Incubación de *Pleurotus ostreatus*

Elaborado por: Tobar, L. (2018)

Durante el periodo de incubación las cajas fueron revisadas cada 12 horas con el fin de descartar la presencia de contaminación.

2.2.3.1.4. Colonización de *Pleurotus ostreatus* en semillas de trigo y avena

Los granos de trigo y avena fueron limpiados de forma manual, posteriormente se lavaron con abundante agua. Con el fin de alcanzar la humedad adecuada para el desarrollo del hongo, los

sustratos fueron remojados por un lapso de 24 horas, pasado este tiempo antes de escurrir el agua residual se verificó que el pH sea de 6.0. Los sustratos se colocaron en una solución de benomyl al 0.02 % durante 10 minutos, para desinfectar las semillas y se escurrió de forma exhaustiva.

Con los sustratos tratados se llenaron las tres cuartas de un envase de vidrio de boca ancha, previamente desinfectados con etanol al 70%. Los envases fueron sellados para ser auto clavados a 121 °C, durante 15 minutos, a una presión de 15 psi (Fotografía 5-2).



Fotografía 5-2. Auto clave de los sustratos de crecimiento

Elaborado por: Tobar, L. (2018)

En la cámara de flujo laminar se procedió a inocular parte del micelio de *Pleurotus ostreatus* previamente colonizado en Agar Sabouraud Dextrosa en las semillas desinfectadas, en presencia de un mechero de alcohol utilizando un aza estéril (Fotografía 6-2).



Fotografía 6-2. Inoculación de los sustratos de crecimientos con *Pleurotus ostreatus*

Elaborado por: Tobar, L. (2018)

Cada recipiente fue sellado con papel aluminio y se procedió a su incubación a 25°C por un tiempo de 10 a 15 días, hasta que el micelio del hongo colonice completamente los sustratos y estos tengan una coloración blanquecina (Fotografía 7-2).



Fotografía 7-2. Incubación de los medios de crecimiento con *Pleurotus ostreatus*

Elaborado por: Tobar, L. (2018)

2.2.3.1.5. Preparación del suelo

Se colocó 3 kg de suelo en nueve recipientes de plástico previamente desinfectados con etanol al 70%. Para el primer tratamiento donde se inoculó el suelo solo con *Pleurotus ostreatus* se utilizó la metodología descrita por Torres, (2017), donde para los 9 kilogramos de suelo que representan las tres repeticiones, se tomaron 8 cajas petri y se realizó un raspado de la superficie que se mezcló en 1600 ml de agua destilada. El envase donde se realizó la mezcla se agitó hasta homogenizar la solución y con la ayuda de un aspersor se aplicó en cada caja aproximadamente 175 ml de la solución. Finalmente, con una espátula esterilizada se homogenizó el suelo, repitiendo este procedimiento tres veces por semana (Gráfico 8-2).



Fotografía 8-2. Preparación del tratamiento 1 - *Pleurotus ostreatus*

Elaborado por: Tobar, L. (2018)

Para los tratamientos 2 y 3, se colocaron 300 g de los sustratos colonizados con *Pleurotus ostreatus* en cada caja como lo recomienda Simbaña, (2016), quien señala que se debe adicionar el 10% del sustrato colonizado en función al peso del suelo a ser tratado, que para la presente investigación es de 3 kg. Para obtener una mezcla homogénea, se procedió a disgregar las semillas colonizadas de forma manual utilizando guantes de látex estériles. Para los tres tratamientos se consideró la humedad del suelo de manera que el hongo tenga las condiciones adecuadas para desarrollarse (Fotografía 9-2).



Fotografía 9-2. Preparación del tratamiento 2 - *Pleurotus ostreatus* +Avena y el tratamiento 3 - *Pleurotus ostreatus* + Trigo

Elaborado por: Tobar, L. (2018)

2.2.3.1.6. Proceso de fructificación de *Pleurotus ostreatus*

El fructificación de *Pleurotus ostreatus* constó de dos etapas:

Primera Etapa: Los recipientes de plástico que contenían el suelo y las semillas colonizadas con *Pleurotus ostreatus* fueron recubiertas con bolsas de plástico de color negro, después fueron colocadas en condiciones de oscuridad y a una temperatura de 25°C. Los recipientes se mantuvieron bajo dichas condiciones hasta que el micelio del hongo haya colonizado mayoritariamente el sustrato. La etapa tuvo una duración de 15 días (Fotografía 10-2).



Fotografía 10-2. Primera etapa de desarrollo de *Pleurotus ostreatus*

Elaborado por: Tobar, L. (2018)

Segunda Etapa: Se retiró la envoltura y se las expuso a periodos de luz de 12 horas y se mantuvo una humedad constante mediante la aspersión de agua.

2.2.3.1.7. Evaluación de la eficiencia de *Pleurotus ostreatus* en la biodegradación de carbaryl

Se evaluó la eficiencia de *Pleurotus ostreatus* a partir del cálculo del porcentaje de degradación, para lo cual se comparó la concentración inicial y final del carbaryl en los tratamientos con la siguiente ecuación (Monge et al., 2009):

$$\% \text{ de degradación de carbaryl} = \frac{[\text{I}] \text{ inicial de carbaryl} - [\text{I}] \text{ final de carbaryl}}{[\text{I}] \text{ inicial de carbaryl}} * 100$$

(Ecuación 1)

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Desarrollo de *Pleurotus ostreatus*

Transcurridos 5 días de la inoculación de las semillas de con *Pleurotus ostreatus* en el medio Agar Sabouraud Dextrosa, se observó la presencia del micelio del hongo dentro de las cajas petri, de color blanquecino y forma algodonosa; éste colonizó cada una de las semillas que se colocaron en las cajas, además no se registró la presencia de contaminantes (Fotografía 1-3).



Fotografía 1-3. Semillas rodeadas de micelio blanquecino

Elaborado por: Tobar, L. (2018)

Transcurrido el décimo día después de la inoculación se observaron dos variantes de crecimiento: la primera fue un micelio algodonoso de una gran densidad, manifestando por un abundante crecimiento en los alrededores de las semillas, zonas cercanas y sobres estas, la segunda variante presentó también características algodonosas y blanquecinas, pero en contraposición a la primera variante esta tuvo un desarrollo y una densidad menor. En el envés de la caja se observó como el micelio se genera de forma exclusiva desde la semilla colocada inicialmente, de esta forma se ratificó que no existió ningún tipo de contaminación durante el proceso de cultivo, al igual que la parte superior de la caja la coloración fue uniforme y blanquecina (Fotografía 2-3).



Fotografía 2-3. Desarrollo de *Pleurotus ostreatus* a los 10 días de inoculado en el medio de cultivo

Elaborado por: Tobar, L. (2018)

La adición de los sustratos de crecimiento se realizó al quinceavo día, donde el crecimiento del micelio fue abundante y de alta densidad, cubriendo en su totalidad y de manera uniforme toda la superficie del medio de cultivo

3.2. Desarrollo de *Pleurotus ostreatus* en los sustratos de crecimiento (Trigo y Avena)

A los quince días de haber inoculado el trigo con el micelio de *Pleurotus ostreatus* se observó una colonización completa del sustrato, todos los frascos de crecimiento presentaron las mismas características. Llegado a este punto los frascos se mantuvieron en refrigeración para disminuir el crecimiento y desarrollo hasta su implementación en el suelo contaminado (Fotografía 3-3).



Fotografía 3-3. Desarrollo de *Pleurotus ostreatus* a los 15 días de inoculado en el sustrato de crecimiento (Trigo)

Elaborado por: Tobar, L. (2018)

Con lo que respecta a la avena, el sustrato presento una colonización completa del micelio a los 18 días de la inoculación; los parámetros de luz y humedad fueron controlados de manera estricta (Fotografía 4-3).



Fotografía 4-3. Desarrollo de *Pleurotus ostreatus* a los 18 días de inoculado en el sustrato de crecimiento (Avena)

Elaborado por: Tobar, L. (2018)

3.3. Concentración inicial de carbaryl en las muestras de suelo

Las concentraciones de carbaryl evaluadas en las tres muestras del suelo, registraron valores que se encontraron en un rango de los 8105 mg/Kg a los 8115 mg/Kg (Gráfico 1-3), esto es un indicativo de que el nivel de contaminación en el suelo es uniforme en toda el área de evaluación.

La contaminación se debe a las diversas fumigaciones con agroquímicos que se hace en esta zona agrícola.

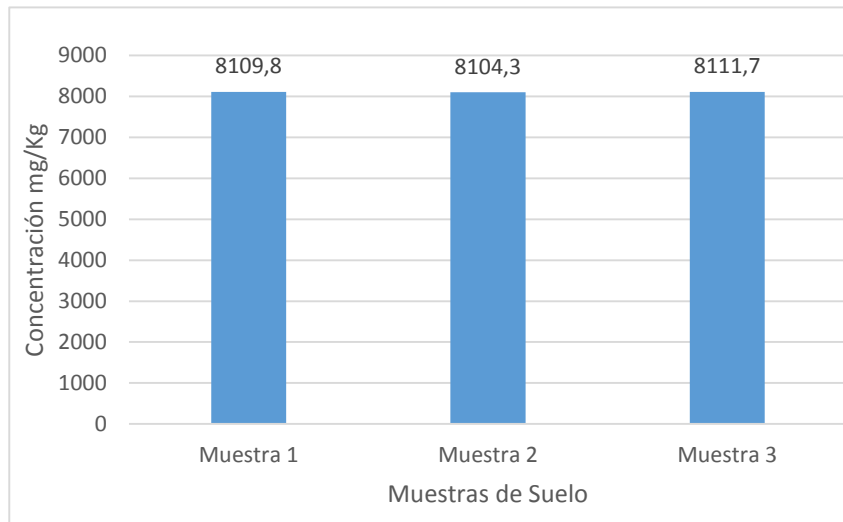


Gráfico 1-3. Concentración de carbaryl en las muestras de suelo

Elaborado por: Tobar, L. (2018)

El cálculo del coeficiente de variación fue de 0.00047, valor que indicó que las concentraciones registradas son homogéneas, por esta razón para los cálculos posteriores se utilizó la media de estos valores que es de 8108.6 mg/Kg como valor referencial para la concentración inicial del carbaryl en el suelo (Tabla 1-3).

Tabla 1-3. Coeficiente de variación y media aritmética de las muestras de suelo

Muestras de Suelo	Concentración
Muestra 1	8109.8 mg/Kg
Muestra 2	8104.3 mg/Kg
Muestra 3	8111.7 mg/Kg
Media	8108.6 mg/Kg
Estadística	
Desviación Estándar	3.84
Coefficiente de Variación	0.00047

Elaborado por: Tobar, L. (2018)

3.4. Desarrollo de *Pleurotus ostreatus* aplicado en el suelo contaminado

3.4.1. Tratamiento 1 – *Pleurotus ostreatus*

El tiempo transcurrido desde la inoculación del suelo hasta la formación del cuerpo fructífero fue de 40 días. La primera etapa requirió de 19 días, hasta observar que el micelio presente en la superficie del suelo ya no aumentó en densidad ni en cobertura. Expuestas las cajas a la luz solar, pasaron alrededor de 12 días hasta observar los primordios en la superficie; se contabilizaron un total de cinco (Fotografía 5-3)



Fotografía 5-3. Desarrollo de los primordios a los 12 días de la aplicación de *Pleurotus ostreatus* sin sustrato de crecimiento

Elaborado por: Tobar, L. (2018)

Desde el momento en que se registró la presencia de los primordios en el suelo, pasaron 9 días hasta que el cuerpo fructífero completó su formación. Este proceso se dio en tres de los cinco primordios, en los restantes se observó crecimiento sin que se completara la formación del cuerpo fructífero (Fotografía 6-3).



Fotografía 6-3. Formación de los cuerpos fructíferos a los 9 días del desarrollo de los primordios

Elaborado por: Tobar, L. (2018)

3.4.2. Tratamiento 2 - *Pleurotus ostreatus* + Avena

Los tiempos de desarrollo del hongo se redujeron con la adición de avena, a diferencia de los tiempos registrados sin la adición de sustrato. La colonización del suelo por el micelio tardó un tiempo aproximado de 17 días; desde que se colocó la caja en presencia de la luz los primordios se pudieron observar al noveno día y se registró un total de nueve estructuras (Fotografía 7-3).



Fotografía 7-3. Desarrollo de los primordios a los 9 días de la aplicación de *Pleurotus ostreatus* con el sustrato de crecimiento (Avena)

Elaborado por: Tobar, L. (2018)

Desde el desarrollo de los primordios transcurrieron 7 días hasta que los cuerpos fructíferos se formen completamente; de las nueve estructuras registradas 4 se formaron completamente y 2 solamente aumentaron sus tamaños, las restantes no registraron desarrollo alguno (Fotografía 8-3).



Fotografía 8-3. Formación de los cuerpos fructíferos a los siete días del desarrollo de los primordios

Elaborado por: Tobar, L. (2018)

3.4.3. Tratamiento 3 - *Pleurotus ostreatus* + Trigo

La adición de trigo permitió acelerar el crecimiento. En la primera etapa de colonización del micelio en el suelo el tiempo se redujo a 15 días, momento en el cual ya no se observó crecimiento micelial en densidad ni en superficie de cobertura; ya en presencia de la luz el tiempo de formación de los primordios también se redujo a 8 días, además se registró el desarrollo de 13 primordios (Fotografía 9-3).



Fotografía 9-3. desarrollo de los primordios a los 8 días de la aplicación de *Pleurotus ostreatus* con el sustrato de crecimiento (trigo)

Elaborado por: Tobar, L. (2018)

El desarrollo de los cuerpos fructíferos requirió de 5 días, los cuerpos presentaron un mayor tamaño. De los 13 registrados 5 crecieron de forma normal, una estructura presentó un mayor crecimiento sin que llegue a desarrollarse de manera completa, los restantes no crecieron (Fotografía 10-3). En total se requirió de 28 días desde la inoculación hasta la presencia de los cuerpos fructíferos.



Fotografía 10-3. Formación de los cuerpos fructíferos a los siete días del desarrollo de los primordios

Elaborado por: Tobar, L. (2018)

3.5. Concentración de carbaryl posterior a la aplicación de los tratamientos en las muestras de suelo

3.5.1. Tratamiento 1 – *Pleurotus ostreatus*

En el primer tratamiento implementado, las concentraciones de carbaryl presentes en el suelo se redujeron de 8108.6 mg/Kg a 4195 mg/Kg. En esta primera iteración el cálculo del coeficiente de variación indicó que las concentraciones obtenidas en las tres repeticiones son homogéneas (Tabla 2-3) este es un indicativo de que la inoculación del hongo fue exitosa en las tres repeticiones y que las condiciones de crecimiento fueron las adecuadas.

Tabla 2-3. Coeficiente de variación y media aritmética del primer tratamiento

Tratamiento 1	Concentración
Repetición 1	4195.3 mg/Kg
Repetición 2	4189.8 mg/Kg
Repetición 3	4200.1 mg/Kg
Media	4195.3 mg/Kg
Estadística	
Desviación Estándar	5.15
Coeficiente de Variación	0.001227564

Elaborado por: Tobar, L. (2018)

En el gráfico 2-3 se observa la diferencia existente entre la concentración inicial y los resultados obtenidos en las tres repeticiones, donde la repetición 1 es la que presenta una mayor disminución, que como ya se indicó con el coeficiente de variación esta no se diferencia de forma significativa de las 2 concentraciones restante.

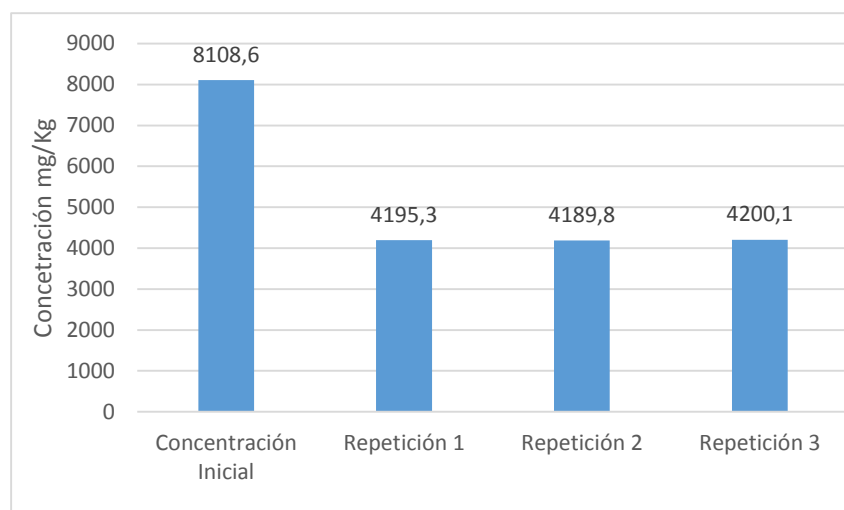


Gráfico 2-3. Concentraciones de carbaryl obtenidas terminada la fase experimental – Tratamiento 1 (*Pleurotus ostreatus*)

Elaborado por: Tobar, L. (2018)

3.5.2. Tratamiento 2 – *Pleurotus ostreatus* + *Avena*

Los resultados obtenidos con el tratamiento 2 concuerdan con el mayor desarrollo del hongo durante la fase experimental, ya que una mayor presencia de cuerpos fructíferos es un indicativo de que existió una mayor degradación del contaminante en el suelo. La concentración media obtenida de carbaryl en este tratamiento fue de 3571.16 mg/Kg, esto representa una disminución extra de 624 mg/Kg del contaminante con respecto al tratamiento 1. Al igual que con el tratamiento 1 las concentraciones obtenidas en cada repetición fueron homogéneas en función al coeficiente de variación calculado (Tabla 3-3).

Tabla 3-3. Coeficiente de variación y media aritmética del segundo tratamiento

Tratamiento 2	Concentración
Repetición 1	3573.7 mg/Kg
Repetición 2	3569.3 mg/Kg
Repetición 3	3570.5 mg/Kg
Media	3571.16 mg/Kg
Estadística	
Desviación Estándar	2.27
Coeficiente de Variación	0.000635648

Elaborado por: Tobar, L. (2018)

En el gráfico 3-3 se observa la diferencia existente entre la concentración inicial y las tres repeticiones realizadas para el tratamiento 2, la diferencia entre las repeticiones es mínima, donde la repetición 2 registro la menor concentración mientras que la repetición 1 presento la mayor concentración.

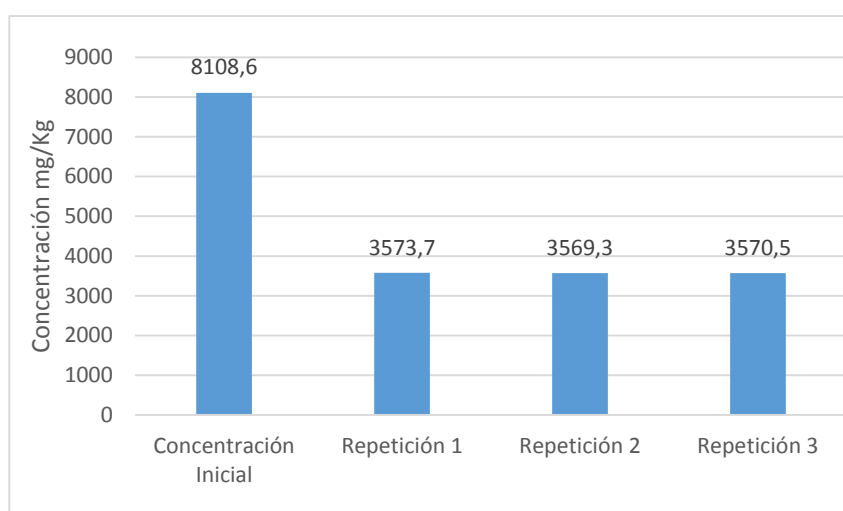


Gráfico 3-3. Concentraciones de carbaryl obtenidas terminada la fase experimental – Tratamiento 2 (*Pleurotus ostreatus* + Avena)

Elaborado por: Tobar, L. (2018)

3.5.3. Tratamiento 3 – *Pleurotus ostreatus* + Trigo

Los resultados obtenidos con el tratamiento 3 resultaron ser más eficientes que con el tratamiento 2; con relación al primero la reducción aumentó en 876 mg/Kg y con el segundo fue de 251.96 mg/Kg. El coeficiente de variación indicó que las concentraciones obtenidas son homogéneas y

que por lo tanto las repeticiones realizadas en la fase experimental fueron llevadas a cabo de forma correcta (Tabla 4-3).

Tabla 4-3. Coeficiente de variación y media aritmética del tercer tratamiento

Tratamiento 3	Concentración
Repetición 1	3318.8 mg/Kg
Repetición 2	3321.1 mg/Kg
Repetición 3	3317.7 mg/Kg
Media	3319.2 mg/Kg
Estadística	
Desviación Estándar	1.73
Coefficiente de Variación	0.00052121

Elaborado por: Tobar, L. (2018)

En el gráfico 4-3 se observa la reducción de las concentraciones registradas para el tratamiento tres, donde en la repetición 3 se obtuvo una mayor reducción con respecto a la concentración inicial.

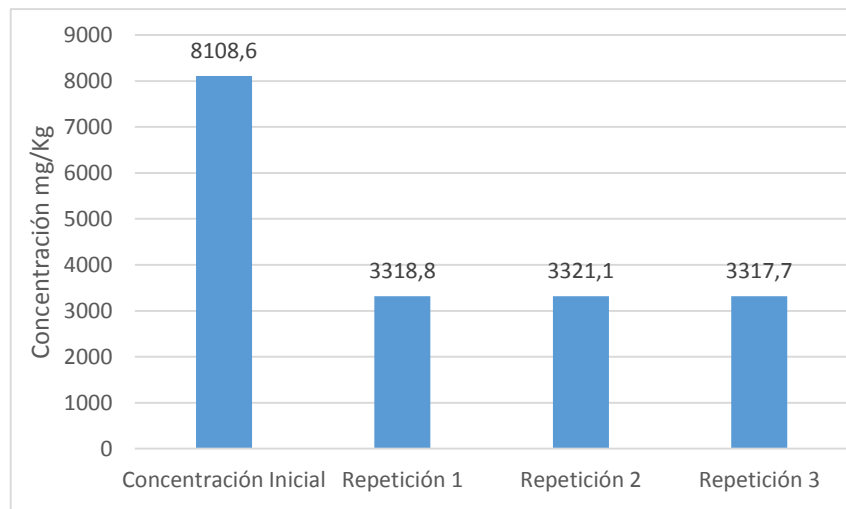


Gráfico 4-3. Concentraciones de carbaryl obtenidas terminada la fase experimental – Tratamiento 3 (*Pleurotus ostreatus* + Trigo)

Elaborado por: Tobar, L. (2018)

3.5.4. Comparación de las concentraciones medias de carbaryl obtenidas en los tratamientos

Como se observa en el gráfico 5-3 el tratamiento que mejor resultado registro fue el número tres seguido muy de cerca por el dos, ambas concentraciones se encuentran alejadas de lo registrado con el tratamiento 1. De esta manera se comprueba que la presencia de un sustrato de crecimiento influye directamente en la degradación del carbaryl, ya que su presencia hace que el hongo pueda desarrollarse en mayor cantidad y crecer más rápido, por ende, este aumento en su actividad hace que la degradación del contaminante sea mayor.

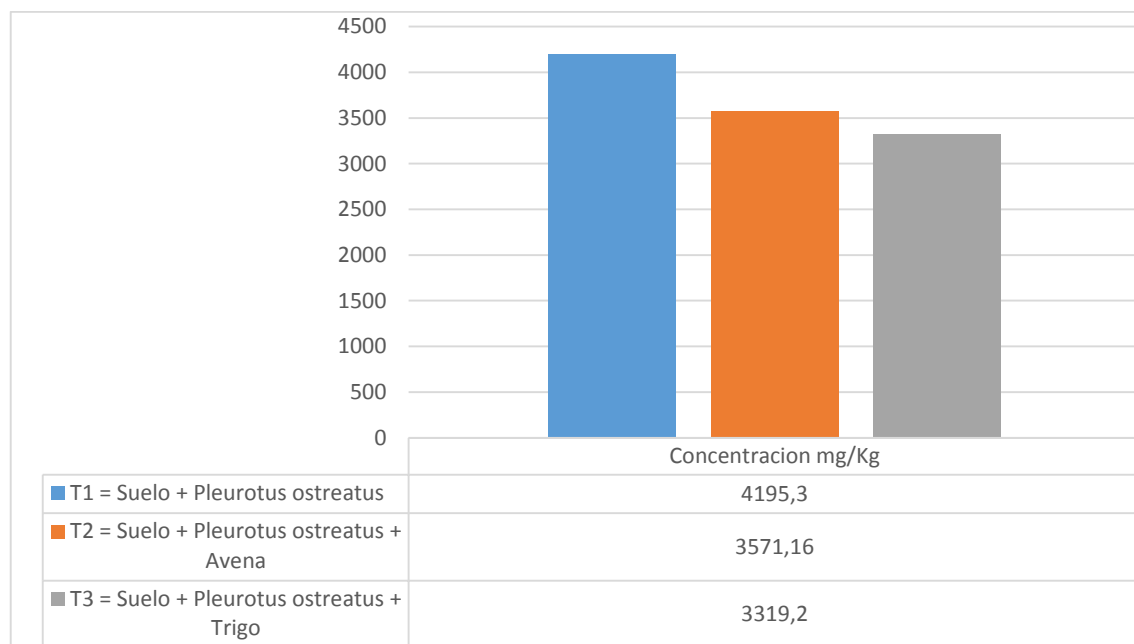


Gráfico 5-3. Comparación de las concentraciones medias de los tratamientos implementados en el suelo

Elaborado por: Tobar, L. (2018)

3.6. Porcentaje de degradación de los tratamientos

En la tabla 5-3 se muestran los porcentajes de degradación calculados para los tres tratamientos implementados en el presente trabajo investigativo.

Tabla 5-3. Porcentajes de degradación de los tratamientos

Tratamientos	Concentración Inicial	Concentración Final	Porcentaje de Degradación	Media por tratamiento
T1r1	8108.6	4195.3	48.26110549	48.26
T1r2		4189.8	48.32893471	
T1r3		4200.1	48.20190908	
T2r1		3573.7	55.92704043	55.95
T2r2		3569.3	55.9813038	
T2r3		3570.5	55.9665047	
T3r1		3318.8	59.07061638	59.06
T3r2		3321.1	59.04225144	
T3r3		3317.7	59.08418223	

Elaborado por: Tobar, L. (2018)

El cálculo del porcentaje de degradación válido lo expuesto en el análisis individual de los tratamientos, con un 59.06% el tratamiento 3 (*Pleurotus ostreatus* + Trigo) fue el que mayor eficiencia registro para la degradación del carbaryl, le sigue el tratamiento 2 (*Pleurotus ostreatus* + Avena) con una eficiencia del 55.95% y por último el tratamiento 1 (*Pleurotus ostreatus* sin sustrato de crecimiento) con un porcentaje de degradación del 48.26% (Gráfico 6-3).

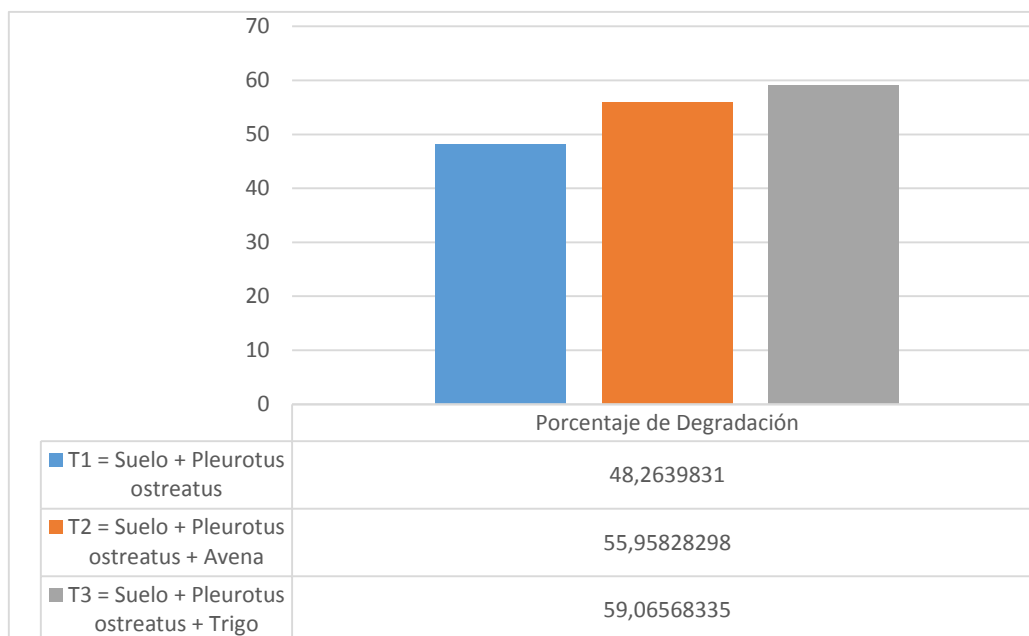


Gráfico 6-3. Comparación de los porcentajes de degradación medios de los tratamientos implementados en el suelo.

Elaborado por: Tobar, L. (2018)

3.7. Análisis estadístico

Hi: El uso de un sustrato de crecimiento para *Pleurotus ostreatus* mejora el porcentaje de degradación del carbaryl presente en el suelo; $p \leq 0.05$

Ho: El uso de un sustrato de crecimiento para *Pleurotus ostreatus* no mejora el porcentaje de degradación del carbaryl presente en el suelo; $p > 0.05$

El análisis de varianza determino si existen diferencias significativas entre los porcentajes de degradación de los tres tratamientos implementados en la presente investigación, el p-valor de los tratamientos fue de < 0.001 (Tabla 6-3), por lo tanto, se acepta la hipótesis alternante y se puede afirmar, que el uso de un sustrato de crecimiento para *Pleurotus ostreatus* mejora el porcentaje de degradación del carbaryl presente en el suelo.

Tabla 6-3. Análisis de varianza de los porcentajes de degradación de los tratamientos

F. V	S.C	g. l	C.M	F	p-valor
Modelo.	185.53	2	92.7	52661.78	< 0.0001
Tratamiento	185.53	2	92.7	52661.78	< 0.0001
Error	0.01	6	1.80E-03		
Total	185.55	8			

Elaborado por: Tobar, L. (2018)

La prueba de Tukey clasificó a las medias en tres grupos A, B y C, esto indicó que entre los porcentajes de degradación las diferencias son significativas, siendo T3 el tratamiento que mejor porcentaje registro a diferencia de los otros tratamientos (Tabla 7-3).

Tabla 7-3. Separación de medias de los tratamientos analizados

Tratamiento	Media	n	E. E			
T1	48.26	3	0.02	A		
T2	55.96	3	0.02		B	
T3	59.07	3	0.02			C

Elaborado por: Tobar, L. (2018)

3.6. Discusión

Durante la fase experimental el control de temperatura y humedad permitió el desarrollo del inóculo de *Pleurotus ostreatus*, con y sin adición de sustrato de crecimiento; el mantenimiento de una temperatura cercana a los 25 °C favoreció el desarrollo micelial, ya que según Suárez (2010) y Coello (2011), las temperaturas entre los 25 °C y 30 °C son óptimas para el crecimiento general del hongo, y se mantuvo además una humedad del 50% al 70%. La verificación de estos parámetros coadyuvaron a alcanzar un 59% de degradación del contaminante, porcentaje que concuerdan con lo reportado por Sánchez, et al., (2006) quien con *Pleurotus ostreatus* y una humedad del 70%, reportó una degradación de hasta un 89% de endosulfán a partir de una concentración inicial de 65 ppm. También, se deben considerar las propiedades físico químicas del suelo y las condiciones ambientales del medio, variables que influyen en el metabolismo del hongo y por consiguiente en los procesos degradativos.

La eficiencia de *Pleurotus ostreatus* para la biodegradación del carbaryl es notable, siendo el tratamiento tres (*Pleurotus ostreatus* + trigo) el que mejores resultados registró al degradar un 59.07 %, seguido de un 55.95 % con el tratamiento dos (*Pleurotus ostreatus* + avena) y finalmente un 48.26% por el tratamiento uno (*Pleurotus ostreatus*), a partir de una concentración inicial registrada en el suelo que fue de 8108.6 mg/Kg. Los resultados guardan relación con lo señalado por Paredes. M, (2017), quien reportó una porcentaje de degradación del 53 % del plaguicida carbamato por acción de *Pleurotus ostreatus*, resultado comparable con el tratamiento 1 de la presente investigación.

La implementación del trigo y la avena como sustratos de crecimiento permitió obtener mayor porcentaje degradativo debido a que éstos permiten la dispersión uniforme del hongo en el suelo y constituyen una fuente primaria de nutrientes, además los compuestos ligninocelulíticos que forman parte de su estructura química son más fáciles de degradar por parte de *Pleurotus ostreatus*, lo que promovió su crecimiento y se reflejó en número de primordios y cuerpos fructíferos.

La tasa de desarrollo y crecimiento posibilita una mayor producción enzimática; dentro de las enzimas que tiene la capacidad de producir *Pleurotus ostreatus* se encuentra la lacasa y peroxidasas, mismas que son capaces de oxidar compuestos xenobióticos, como los plaguicidas orgánicos, a partir del oxígeno (Conrado, et al., 2004). La capacidad de degradar este tipo de compuestos está asociado a la capacidad de *Pleurotus ostreatus* para degradar lignina, un polímero aromático que forma parte de las paredes celulares vegetales; la lignina se biodegrada en la parte externa de la célula fúngica a través de un sistema de oxidación que está conformado por las enzimas extracelulares lacasas y peroxidasas, sistema que es capaz de oxidar también los

contaminantes aromáticos (Rodríguez, et al., 2004). Todo este proceso se ve complementado con la adición de los sustratos ya que como lo menciona Quinteros, (2006), su adición estimula la producción de enzimas en los procesos de biorremediación, debido a que el sistema de metabolismo ligninolítico es inducido por el aumento de nutrientes como el nitrógeno y el carbono, elementos que forman parte en gran porcentaje de los granos de trigo y avena.

La normativa ecuatoriana no tiene como tal establecido un límite máximo permisible para la concentración de Carbaryl en el suelo, pero si para el Carbofuran, ambos son plaguicidas carbamatos por lo que este parámetro puede ser tomado como una referencia, el límite máximo permisible para suelo agrícola es de 0.01 mg/kg, el cual se encuentra muy por debajo de lo registrado en el suelo, antes y después de aplicar los tratamientos con *Pleurotus ostreatus*, a pesar de esto se debe tener en cuenta que el mejor tratamiento en esta investigación logró degradar más del 50% de la concentración inicial, demostrándose la capacidad que tiene el hongo para ser utilizado en procesos de remediación ambiental, ya que al replicar el procedimiento sobre el suelo tratado se lograría alcanzar el valor establecido por la normativa.

CONCLUSIONES

- La concentración media de Carbaryl registrada en la muestra 1 de suelo fue de 8109.8 mg/Kg, en la muestra 2 de 8104.3 mg/Kg y en la muestra 3 de 8111.7 mg/Kg, con una media de 8108.6 mg/Kg; en función a la distribución de las muestras y el coeficiente de variación de 0.00047 se establece que la superficie de estudio presentó niveles de contaminación homogéneos.
- El tratamiento 3 (*Pleurotus ostreatus* + trigo) fue el que favoreció la mayor degradación de carbaryl en un 59.06%, seguido del tratamiento 2 (*Pleurotus ostreatus* + avena) con el 55.95%, y finalmente el tratamiento 1 donde sólo se usó solo *Pleurotus ostreatus* que presentó el menor porcentaje de degradación con el 48.26 %
- El uso de sustratos de crecimiento permite obtener mejores resultados frente a la inoculación directa del hongo en el suelo, al potenciar el metabolismo del hongo por ser una fuente directa de nutrientes, por lo tanto, se producirá un aumento en la capacidad enzimática que permitirá degradar un mayor porcentaje del contaminante.
- Dentro del análisis estadístico la prueba de Tukey determinó que las diferencias existentes entre los tres tratamientos evaluados son significativas, estableciendo que el tratamiento 3 *Pleurotus ostreatus* + trigo es la mejor alternativa.
- El sistema enzimático extracelular de *Pleurotus ostreatus* permitió la degradación del Carbaryl ya que tienen la capacidad de sintetizar enzimas como la lacasa, la manganeso peroxidasa y la lignina peroxidasa, las cuales facilitan la oxidación de los compuestos que conforman los plaguicidas.

RECOMENDACIONES

- Realizar estudios comparativos con otras especies de hongos de la pudrición blanca, de forma individual y como consorcio, determinando la eficiencia en los porcentajes de degradación.
- Probar otros tipos de sustratos de crecimiento y suelos con otros contaminantes, evaluando la adaptabilidad, el crecimiento del hongo y su capacidad de degradación
- Habiendo evaluado la eficiencia de degradación del hongo en el sustrato de trigo se debe implementar el tratamiento a mayor escala en los sitios contaminados con carbaryl de esta forma se podrá evaluar el comportamiento del hongo en condiciones ambientales no controladas.

BIBLIOGRAFÍA

AGROSIEMBRA. Agrosiembra. [En línea] (Reporte), 2016. [Consulta: 10 de octubre de 2017]. Disponible en: http://www.agrosiembra.com/nc=CEBICID_80_WP-143.

AHMAD, Riaz. et al., *Aging reduces the bioavailability of even a weakly sorbed pesticide (Carbaryl) in soil.* 2004, *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 23, págs. 2084-2089.

BARR, David y STEVEN, Aust. *Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants.* 1994, *Environmental Science & Technology*, Vol. 28, págs. 78A-87A.

BARTUAL, J. y BERENQUER, M. *Pesticidas, clasificación y riesgos principales.* Instituto Nacional de seguridad e higiene en el trabajo. Barcelona: INSHT.

CAMERON, Michael. et al., *Enzymology of Phanerochaete chrysosporium with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics.* 2000, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 54, págs. 751-758.

CARDENAS, Milady. *Manejo de agroquímicos clasificación y características.* 2000, Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa, págs. 1-54, Resumen.

CASTELLANOS, José y RACHE, Leidy. *Microorganismos, enzimas, plásmidos y genes involucrados en la degradación de plaguicidas N-metilcarbamatos.* 2013, *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, Vol. 29, págs. 105-119.

CASTELLANOS, J y GALVIS, J. *Rutas de Degradación del plaguicida Nmetil Carbamato Carbaril.* 2015, *Investigación, innovación, ingeniería*, págs. 135-147. 135-147.

CHAPALAMADUGU, S. y CHAUDHRY, G. *Hidrolisis of carbaryl by a Pseudomonas sp. and construction of a microbial consortium that completely metabolizes carbaryl.* 1991, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 57, págs. 744-750.

COELLO, Jessica Marisol. *Aplicación del hongo pleurotus ostreatus como alternativa para la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados.* [En línea] (Tesis). (Titulación). *Escuela Superior Politecnica del Litoral, Guayaquí, Ecuador.* 2011. [Consulta: 23 de septiembre de 2017]. Disponible en: <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/21150/1/D-92862.pdf>.

COLLINS, P. et al., Oxidation of Anthracene and Benzo[a]pyrene by Laccases from. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(12), 4563-4567.

CONRADO, Vidal, et al., *Producción de lacasas y generación de nuevas isoformas en cultivo sólido de Pleurotus ostreatus y Agaricus bisporus infectados con Trichoderma sp.* 2004, *Biología y Bioingeniería*, págs. 1-2.

DESAINT, Stéphane. et al., *Genetic diversity of carbofuran-degrading.* 2000, *Microbiology Ecology*, Vol. 34, págs. 173-180.

DODDAMANI, Hanumanthanaik y NINNEKAR, Harichandra. *Biodegradation of Carbaryl by a Micrococcus Species.* 2001, *Current Microbiology*, Vol. 43, págs. 69-73.

DORRONSORO, Carlos. Edafología y química agrícola. [En línea] (Publicación). *Universidad de Granada, Granada, España.* 2007. [Consulta: 14 de octubre de 2017]. Disponible en: <http://www.edafologia.net/>.

DURÁN, L y LADERA, M. *Biorremediación de suelos contaminados por organoclorados mediante estimulación de microorganismos autoctonos, utilizando biosólidos.* 2016, *Nexo-Revista Científica*, págs. 22-28.

DURKIN, Patrik y KING, Cynthia. *Carbaryl human health and ecological risk assessment revised final report.* [En línea] (Reporte) 2008. [Consulta: 10 de octubre de 2017]. Disponible en: <https://www.fs.fed.us/foresthealth/pesticide/pdfs/052-01-05aCarbaryl.pdf>

FERRER, Ana. *Intoxicación por plaguicidas.* 2003. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, Vol. 26, págs. 155-171. [En línea] (Artículo). [Consulta: 11 de octubre de 2017]. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272003000200009

GOMEZ, Domingo. *Recuperación de espacios degradados.* 2004. Mundi-Prensa, pág. 583.

GONZALEZ, Guillermo. *Intoxicación por Plaguicidas.* [En línea] (Tesis). (Maestría). *Universidad Nacional de Colombia, Cartagena, Colombia.* 2011 [Consulta: 13 de septiembre de 2017]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/4258/1/598928.2011.pdf>

HAYES, W. *Pesticides studies in man.* 1991, *Lawer ER*, págs. 731-868.

HERMOSILLA, Carlos y SÁNCHEZ, Julian. *Libro de las setas de Castilla - La Mancha.* Burgos : Diario de Burgos, 2003.

HERNANDEZ , B. et al., *Metabolism of and inhibition by chlorobenzoates in Pseudomonas putida P111*. 1991, Applied and environmental microbiology, Vol. 57, págs. 3361-3366.

HOFRICHTER, Martín. *Lignin conversion by manganese peroxidase*. 2002, Enzyme and Microbial Technology, Vol. 30, pág. 461.

HOWARD, P. *Handbook of environmental fate and exposure data for organic chemicals*, Lewis_Publisher Finagro. [En línea] (Reporte), 1991. [Consulta: 15 de octubre de 2017]. Disponible en: http://www.finagro.com.co/html/i_portals/index.php

HOWLAND, L. et al., *Antidotes in Depth*. 1998, Goldfrank's toxicologic emergencies, págs. 1445-1449.

JAY, Michael. Invernaderos Green House. [En línea] (Reporte), 2010. [Consulta: 13 de octubre de 2017]. Disponible en: <http://los-invernaderos.blogspot.com/2010/09/el-cultivo-del-hongo-seta-pleurotus.html>.

KOSHLUKOVA, S y REED, N. *Enciclopedia of toxicology*. 2014, Elsevier, págs. 668-672.

Larkin, M y Day, M. *The metabolism of Carbaryl by three bacterial isolates , Pseudomonas sp. (NCBI 12042 and 12043) and Rhodococcus sp. (NCIB12038) from garden Soil*. 1986, Bacteriology app, págs. 233-242.

LARTIGUES, S y GARRIGUES, P. *Degradation kinetics of organophosphorus and organonitrogen pesticides indifferent waters under various environmental conditions*. 1995, Environ, Vol. 29, págs. 1246-1254.

LIMA, María. et al., *Combined Effects of Soil Moisture and Carbaryl*. 2010, Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry_Biological Responses to Contaminants, págs. 243-247.

MONGE, Onofre. et al., *Efecto del pH en el Proceso de Biosorción de Cobre con Bacterias Aerobias*. 2009, Bio Tecnología, págs. 24 - 47.

MONTGOMERY, Jhon. *Groundwater Chemicals Desk Reference*. Virginia : CRC PRESS, 2007.

MOREIRA, Teresa. et al., *Manganese peroxidase production by Bjerkandera sp*. 2000, Bioprocess Engineering, Vol. 23, págs. 657-661.

NARVÁEZ, Jhon. et al., *Persistencia de plaguicidas en el ambiente y su ecotoxicidad*. 2001, Revista de Gestión y Ambiente, págs. 27-38.

NAVARRO, Simón y BARBA, Alberto. *Comportamiento de los plaguicidas en el medio ambiente.* 1995, Departamento de Química agrícola, Geología y Edafología, Facultad de Química, Ministerio de Agricultura, pesca y amilentación, págs. 8-26.

PAREDES, Michelle. Evaluación de la biodegradación de un insecticida carbamato en muestra de suelo de cultivo de papa, mediante *Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatus*. [En línea] (Tesis). (Titulación). *Universidad Politécnica Salesiana, Quito, Ecuador.* 2017. [Consulta: 24 de septiembre de 2017]. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/13842/1/UPS-QT11514.pdf>.

PUERTO, Rodríguez. et al., *Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud.* 2014, Revista Cubana de Higiene y Epidemiología, págs. 372-387.

QUINTERO, Juan. Degradación de plaguicidas mediante hongos de la pudrición blanca de la madera. [En línea] (Tesis). (Titulación). *Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.* 2011. [Consulta: 10 de octubre de 2017]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/28649/1/26394-92497-1-PB.pdf>.

RAMÍREZ, J y LASCAÑA, M. *Plaguicidas, uso, toxicología y exposición.* 2001, Instituto Nacional de la Salud Pública, Vol. 4, págs. 68-69,71-73.

RODRÍGUEZ, E. et al., *Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four Pleurotus species: the role of laccase and versatile peroxidase.* 2004, Soil Biology & Biochemistry, págs. 909-916.

SÁNCHEZ, Jose y ROYSE, Daniel. *La Biología y el cultivo de Pleurotus spp.* México : Hispanoamerica, 2002.

SÁNCHEZ, José. et al., *El sustrato degradado por Pleurotus pulmonaris para la degradación de insecticida endosulfán.* 2006, Centro de Investigación Científica_Unach, págs. 199-207.

SÁNCHEZ, M. Los Plaguicidas. Adsorción y evolución en el suelo. [En línea] (Publicación). *Universidad de Salamanca, Salamanca, España.* 2000. [Consulta: 20 de septiembre de 2017]. Disponible en: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/12919/1/plaguicidas.pdf>.

Sato, Hiroki. et al., *Temporal cortex activation during speech recognition.* 1999, Cognition, Vol. 73, págs. 55-56.

SILVA, Sandra y CORREA, Francisco. *Análisis de la contaminación del suelo: revisión de la normativa y posibilidades de regulación económica.* 2009, Scielo, págs. 13-34.

SIMBAÑA, Carlos. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de la parroquia Taracoa en Francisco de Orellana, mediante el hongo *Pleurotus ostreatus*. [En línea] (Tesis). (Titulación). *Escuela Superior Politecnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.* 2016. [Consulta: 30 de agosto de 2017]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/4916/1/236T0192.pdf>.

SMITH, A. *Chlorinated hydrocarbon insecticides.* 1991, Academic press, Handbook of pesticides toxicology, págs. 731-804.

STAMATIU, Katina. *Tolerancia y Biodegradación de Plaguicidas con hongos filamentosos.* 2013, Instituto de Enseñanza e Investigación en Ciencias Agrícolas. Montecillo : s.n.,.

SUÁREZ, Carolina. Obtención in vitro de micelio de hongos comestibles, Shiitake (*Lentinula edodes*) y orellanas (*Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus pulmonarius*) a partir de aislamientos de cuerpos fructíferos, para la producción de semilla. [En línea] (Tesis). (Titulación). *Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia,* 2010. [Consulta: 30 de agosto de 2017]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/2792/1/107407.2010.pdf>.

SWETHA, Vandana y PHALE, Prashant. *Metabolism of Carbaryl via 1,2-Dihydroxynaphthalene by Soil Isolates Pseudomonas sp. Strains C4, C5, and C6.* 2005, Applied and environmental Microbiology, Vol. 71, págs. 5951-5956.

TORRES, Evelyn. Evaluación de la biodegradación de un insecticida piretroide en muestra de suelo del cultivo de papa mediante la adición de *Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatus*. [En línea] (Tesis). (Titulación). *Universidad Politecnica Salesiana, Quito, Ecuador.* 2017. [Consulta: 25 de septiembre de 2017]. Disponible en: <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/13679/1/UPS-QT11493.pdf%20>.

UPADHYAY , R. et al., *Effect of organic nitrogen supplementation in Pleurotus.* 2006. *Chambaghat_UAEM,* págs. 225-232, 968-878.

URLACHER, Vlada y EIBEN, Sabine. *Cytochrome P450 monooxygenases: perspectives for synthetic application.* Trends in Biotechnology, Vol. 24, págs. 324-330.

WOOD, P. *Metabolism of aromatic hydrocarbons by the cytochrome P-450 system and epoxide hydrolase.* Biochemical Society Transactions, Vol. 20, págs. 349-352.

