

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**ÍNDICES DE HUMIFICACIÓN COMO INDICADORES DE LA  
ESTABILIDAD DE RESIDUOS LIGNOCELULÓTICOS DEGRADADOS CON  
HONGOS LIGNINOLÍTICOS**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de Los requisitos para optar al título de Ingeniero en Recursos Naturales.

**BASTIAN DARIO GALLARDO SALAS**

TEMUCO - CHILE  
2013

**UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES**



**ÍNDICES DE HUMIFICACIÓN COMO INDICADORES DE LA  
ESTABILIDAD DE RESIDUOS LIGNOCELULÓTICOS DEGRADADOS CON  
HONGOS LIGNINOLÍTICOS**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de Los requisitos para optar al título de Ingeniero en Recursos Naturales.

BASTIAN DARIO GALLARDO SALAS

PROFESOR GUIA: DR. PABLO CORNEJO RIVAS

TEMUCO - CHILE  
2013

# **ÍNDICES DE HUMIFICACIÓN COMO INDICADORES DE LA ESTABILIDAD DE RESIDUOS LIGNOCELULÓTICOS DEGRADADOS CON HONGOS LIGNINOLÍTICOS**

**PROFESOR GUIA:**

DR. PABLO CORNEJO RIVAS

Ingeniero Agrónomo Doctor en Biología Agraria y Acuicultura  
Departamento de Ciencias Químicas y Recursos Naturales.  
Facultad de Ingeniería, Ciencias y Administración

**PROFESOR CONSEJERO:**

DR. CESAR ARRIAGADA ESCAMILLA

Ingeniero Forestal, Doctor Ingeniero de Montes  
Departamento Ciencias Forestales  
Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales

**CALIFICACION PROMEDIO TESIS:**

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecer a Dios por generar las circunstancias que permitieron, con esta tesis terminar una significativa etapa de aprendizaje.

Agradecer la voluntad, confianza y el valioso tiempo del Dr. Pablo Cornejo Rivas que además de ser el profesor guía de esta tesis fue uno de los pilares fundamentales en mi proceso formativo dentro de la Universidad.

De igual manera agradecer el financiamiento del proyecto FONDECYT N° 1120890 “Use of chemically stabilized compost together with selected arbuscular mycorrhizal fungi as a tool for the bioremediation of copper and arsenic polluted soils in the Puchuncaví valley” a cargo del Dr. Pablo Cornejo Rivas.

De esta misma forma agradecer el apoyo incondicional de mi padre Vladimir Gallardo y la confianza y el cariño único de Lucas y Cristóbal Gallardo.

Por último, pero no menos importante agradecer el trabajo realizado por Luis Orellana y Jorge Medina, quienes con sus análisis aportaron de manera significativa a este estudio.

## INDICE

| <b>Capítulo</b> |  | <b>Página</b> |
|-----------------|--|---------------|
| 1.              | INTRODUCCION   | 1             |
| 2.              | REVISION BIBLIOGRAFICA                                     | 3             |
| 2.1             | Residuos lignocelulóticos                                  | 4             |
| 2.3             | Componente de la biomasa lignocelulósica                   | 5             |
| 2.3.1           | Celulosa   | 5             |
| 2.3.2           | Hemicelulósica   | 6             |
| 2.3.3           | Lignina  | 8             |
| 2.3.4           | Pectina  | 9             |
| 2.4             | Hongos saprobios en el suelo                               | 9             |
| 2.5             | Hongos saprobios de la madera                              | 9             |
| 2.5.1           | Hongos de la podredumbre blanda                            | 9             |
| 2.5.2           | Hongos de la podredumbre blanca                            | 9             |
| 2.5.3           | Hongos de la podredumbre parda                             | 10            |
| 2.5.4           | Hongos que tiñen la madera                                 | 10            |
| 2.6             | Sustancias húmicas   | 11            |
| 2.6.1           | Composición de las sustancias húmicas                      | 11            |
| 2.6.1.1         | Acido húmico   | 11            |
| 2.6.1.2         | Ácido fúlvico  | 12            |
| 2.6.1.3         | Huminas  | 13            |
| 2.6.1.4         | Composición elemental de las sustancias húmicas            | 13            |
| 2.6.2           | Propiedades y aplicaciones de sustancias húmicas           | 13            |
| 2.6.3           | Proceso de extracción y purificación de sustancias húmicas | 14            |
| 2.6.4           | Efectos de las sustancias húmicas sobre el suelo           | 15            |
| 2.6.4.1         | Efectos físicos sobre el suelo                             | 15            |
| 2.6.4.2         | Efectos químicos sobre el suelo                            | 15            |

|         |   |    |
|---------|---|----|
| 2.6.4.3 | Efectos biológicos sobre el suelo                   | 16 |
| 2.7     | Estabilización de la materia orgánica en el suelo   | 16 |
| 2.8     | Aporte del estudio a un desarrollo sustentable      | 16 |
| 3.      | MATERIALES Y METODOS                                | 18 |
| 3.1     | Cultivo de los aislados en placa                    | 18 |
| 3.2     | Unidades experimentales                             | 19 |
| 3.3     | Diseño experimental                                 | 19 |
| 3.4     | Muestreo  | 20 |
| 3.5     | Índices de humificación                             | 20 |
| 3.6     | Extracción de sustancias húmicas                    | 21 |
| 3.7     | Análisis estadístico                                | 22 |
| 3.7.1   | Análisis de la varianza unifactorial                | 22 |
| 3.7.2   | Análisis factorial                                  | 22 |
| 3.7.3   | Análisis de conglomerado.                           | 22 |
| 4.      | PRESENTACION DE RESULTADOS                          | 23 |
| 4.1     | Índice de humificación hongo / aditivo químico.     | 23 |
| 4.2     | Índice de humificación por tratamiento              | 25 |
| 4.3     | Análisis de correlaciones y componentes principales | 27 |
| 4.4     | Acidez total y grupos funcionales                   | 30 |
| 4.3     | Evolución temporal de los índices de humificación   | 32 |
| 5.      | DISCUSION   | 36 |
| 6.      | CONCLUSIONES  | 38 |
| 7.      | RESUMEN   | 39 |
| 8.      | SUMMARY   | 40 |
| 9.      | LITERATURA CITADA                                   | 41 |

## 1. INTRODUCCIÓN

Según estudios realizados por la división de información y relaciones externas de la UNFPA (2011), el crecimiento de la población mundial registró un explosivo aumento desde alrededor del año 1950 debido a la disminución de la mortalidad en regiones menos desarrolladas, lo que trajo consigo una mayor necesidad de producción de alimentos. Esto se tradujo en un necesario aumento de superficie utilizada para cultivos de alimentación primaria, como el trigo. Este cultivo alcanza en la actualidad una superficie total de 225,62 millones de hectáreas alrededor del mundo.

Por otra parte, los índices de cosecha de las variedades actuales de trigo no superan el 50% (Evans 1993), por lo que la cantidad de residuos abundantes en lignina que quedan en el campo luego de la cosecha es igual o mayor a la biomasa cosechada. En el cultivo de cereales esto significa dejar sobre la superficie del suelo varias toneladas de paja por hectárea.

Relacionado a lo anterior, en la agricultura nacional la quema de rastrojo es el manejo habitual antes del próximo cultivo; sin embargo, esta práctica trae consigo problemas de contaminación ambiental, pérdida de nutrientes y riesgo de propagación de incendios, que coincide con una época seca, por lo que éstos eventos son de difícil control. Además, es necesario considerar que contar con una cubierta orgánica facilita una mayor conservación de las aguas lluvias, disminuye el riesgo de erosión hídrica y eólica y facilita la disponibilidad de nutrientes en el suelo, lo que hace necesario centrar la atención en las distintas alternativas disponibles para el manejo de estos residuos.

Para evaluar nuevas alternativas de manejo que incorporen residuos al suelo es necesario contemplar que este proceso requerirá un periodo de tiempo significativo para lograr que estos se oxiden en gran medida previo a su aplicación al suelo, para que no causen efectos negativos en éste (Orellana, 2012). Por otra parte, el producto generado debe ser estable, y con un alto tiempo de residencia de los residuos incorporados al suelo.

Por lo anterior, como hipótesis de este trabajo, podemos sugerir que la utilización de alternativas que promuevan una rápida degradación de los residuos lignocelulóticos, en conjunto con otras alternativas que generen interacciones estables, permitirán la obtención de productos con una alta proporción de sustancias húmicas estables.

Para contrastar la hipótesis anterior, el Objetivo General de este trabajo será: **“Analizar la evolución temporal de la humificación de residuos lignocelulóticos como un indicador de la efectividad de determinados aislados de hongos saprobios y aditivos químicos como estabilizantes de compost basados en residuos de cosecha de trigo obtenidos en la zona sur de Chile”**.

Objetivos específicos:

- Analizar los cambios en la humificación de los residuos de trigo a lo largo de un proceso de compostaje.
- Determinar las combinaciones de especie de hongos ligninolíticos, aditivo químico utilizado, y tiempo de aplicación del aditivo químico que generen una mayor estabilización de las sustancias húmicas producidas en el proceso de compostaje.
- Describir y cuantificar los principales grupos funcionales presentes en los compost y sustancias húmicas generadas al final del proceso de compostaje en algunas combinaciones hongo por aditivo.

## 2. REVISION BIBLIOGRAFICA

Muchos de los países en desarrollo cuentan con el potencial para aumentar sustancialmente la producción de alimentos, y con las tecnologías actuales solamente una pequeña fracción de este aumento podría provenir de la expansión del área de terreno bajo producción. Por lo anterior, el reto es mantener es actual área agrícola tan productiva como se pueda, aumentando los rendimientos. Por otra parte, la erosión, la salinización, la lixiviación de nutrientes y el aumento en la toxicidad proveniente del uso de fertilizantes químicos y pesticidas pueden contribuir a la degradación del suelo, disminuyendo su calidad y capacidad de producción. No obstante, existen formas para aumentar el rendimiento de los cultivos y mantener la calidad del suelo (UNFPA, 2011).

En Chile, a diciembre del 2011 los cultivos anuales alcanzaron una superficie sembrada de 686.670 hectáreas, dentro de la cual los cereales significan el 80%, con 545.824 hectáreas. De esta última cifra, el trigo ocupa el 44,9% de la superficie de siembra; el maíz, el 25,5%; la avena, el 18,5%, y el arroz, el 4,4%. El trigo, además de ser el cereal más cultivado en Chile, tiene una gran importancia socioeconómica. Es cultivado mayoritariamente por pequeños productores y se utiliza en la elaboración del pan, principal alimento de consumo masivo. Existen aproximadamente 45 mil explotaciones con cultivo de trigo. De ellas, el 87% tiene menos de 50 hectáreas de superficie, maneja el 32% de la superficie de siembra y produce el 22% del trigo nacional. En el Censo Agropecuario también se informa que, de los productores que forman parte de este segmento, el 76% tiene baja escolaridad (sin escolaridad o básica incompleta) y el 50% son mayores de 60 años; por lo tanto, corresponden mayoritariamente a explotaciones con bajos niveles de innovación tecnológica y baja productividad (ODEPA, 2012). Adicionalmente, la producción de estos cultivos genera un importante volumen de residuos de cosecha, muchos de los cuales no son adecuadamente tratados, siendo común que la gran mayoría de ellos se incinere una vez terminada la cosecha a la espera del cultivo siguiente en la rotación.

Los residuos agrícolas disponibles, se estiman a nivel mundial en 1.010 millones de toneladas, siendo los residuos de cereales la principal fuente, aportando dos tercios de la cantidad

total disponible (Gabrielle y Gagnaire, 2008). Por lo tanto, los residuos de cereales son una considerable fuente de biomasa renovable en países con gran superficie de suelos disponible (Sanchez et. al., 2009).

Los tejidos de las plantas verdes contiene entre un 60-90% de su peso en agua. Si los tejidos de la planta se secan, removiendo todo al agua contenida y se analiza su materia seca, su contenido será aproximadamente 90-95% de carbono (C), oxígeno (O) e hidrógeno (H) (Brady y Weil, 2002). Por lo anterior, el manejo de residuos vegetales puede ser decisivo en la dinámica de la materia orgánica (MO) y en la mantención de la fertilidad en los suelos, por lo que según Gliessman (2002) deben ser vistos como elementos útiles y de valor para el mantenimiento de la MO en el suelo, presentando técnicas para incorporarlo al suelo como una alternativa a la quema.

La MO es vital para la fertilidad del suelo, ya que mejora la agregación de partículas, la absorción de agua y el contenido de aire, disminuye el escurrimiento superficial (Bellapart, 1996), facilitando el laboreo y el desarrollo radical de las plantas (Honorato, 1993), aumentando el intercambio catiónico y amortiguando los cambios de pH en el suelo. Además de lo anterior, la MO es de suma importancia en los cambios que realizan los organismos en el suelo, y favorece el control biológico de plagas y enfermedades (Guerrero, 1996). Al mismo tiempo, determina cambios biológicos, físicos y químicos. Es un fertilizante de acción lenta y da origen al ciclo biológico de nutrientes en el suelo (Honorato, 1993).

## **2.1 Residuos lignocelulóticos**

Según lo descrito por Fengel y Weneger (1984), los residuos lignocelulóticos engloban al conjunto de materiales constituidos por celulosa, lignina, hemicelulosa y pectina en diferente proporción según su procedencia. Estos residuos de naturaleza lignocelulótica pueden ser de origen industrial, forestal, urbano y agrícola. Estos materiales que generalmente constituyen desechos, pueden ser revalorizados y utilizados como materia prima de numerosos productos químicos y biológicos que están constituidos por los componentes que integran a estos residuos. La transformación y descomposición de estos materiales en productos derivados, mediante

hidrólisis y oxidaciones enzimáticas, es muy importante para su bioconversión e incorporación en el ciclo del C. Para esto, muchos de estos materiales requieren de la participación de sistemas enzimáticos complejos que sólo algunos grupos particulares de microorganismos presentan, como lo son los hongos ligninolíticos. Este grupo de hongos ha desarrollado un sistema enzimático único y no específico que funciona en el ambiente extracelular. El mecanismo del sistema degradador de lignina está basado en la producción primaria de radicales libres. Este mecanismo permite que estas enzimas sean catalíticamente activas sobre una gran diversidad de sustratos orgánicos.

La enorme diversidad estructural de los contaminantes que son degradados por estos hongos les confiere además un uso potencial en biorremediación. Por ejemplo, estos hongos han sido efectivos en la degradación de una diversidad de contaminantes ambientales peligrosos de carácter orgánico (Dávila y Vásquez-Duhalt, 2006).

La mayoría de los hongos ligninolíticos pertenecen al grupo Basidiomicetes y son los microorganismos más eficientes en degradar totalmente la lignina. Estos organismos secretan varias enzimas extracelulares que son esenciales para la transformación inicial de la lignina y que en conjunto logran su mineralización.

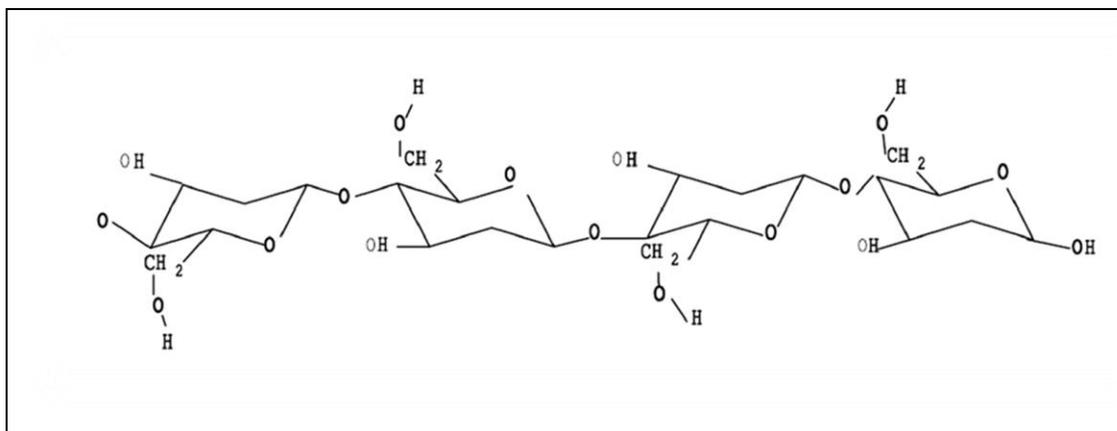
Como los residuos de cosecha de cereales son considerados como un material lignocelulótico con un interés significativo para su utilización energética, agrícola e industrial realizaremos una revisión de los principales componentes de este residuo.

## **2.3 Componentes de la biomasa lignocelulósica**

### **2.3.1 Celulosa**

La celulosa, componente mayoritario de las paredes celulares de las fibras de madera, es un polímero lineal de  $\beta$ -D-Glucosa con un peso molecular de aproximadamente 500.000 g/mol. Las moléculas individuales de glucosa están unidas por enlaces  $\beta$ -(1,4). El número de azúcares de

cadena (grado de polimerización G.P.), varía en los diferentes materiales celulósicos (Oliva, 2003).

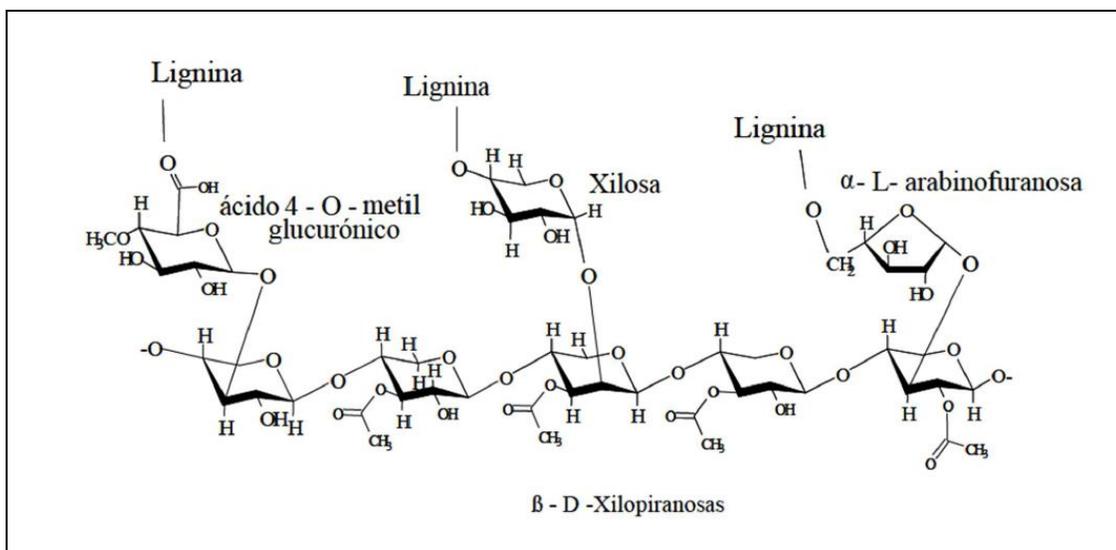


**Figura 1:** Estructura primaria de la celulosa (Tomas, 2010)

### 2.3.2 Hemicelulosa

Es un compuesto aún mal definido que aparece en los residuos en forma amorfa o paracristalina con un grado de complejidad intermedio. El término hemicelulosa incluye una vasta mezcla de polisacáridos heterogéneos como el xiloglucano, arabinogalactano, galactano, manano y glucomanano, formados fundamentalmente por xilosa, arabinosa, galactosa, manosa, glucosa y ácido galacturónico. Todas las hemicelulosas poseen una especie de columna vertebral formada por una cadena plana de azúcares unidos, casi siempre mediante enlaces  $\beta$  (1-4), de las que pueden salir ramificaciones muy cortas, generalmente de un solo azúcar. Poseen alguna característica estructural que impide formar agregados como las cadenas de celulosa, aunque se pueden co-cristalizar con éstas por medio de puentes de hidrógeno (Aranda, 2006).

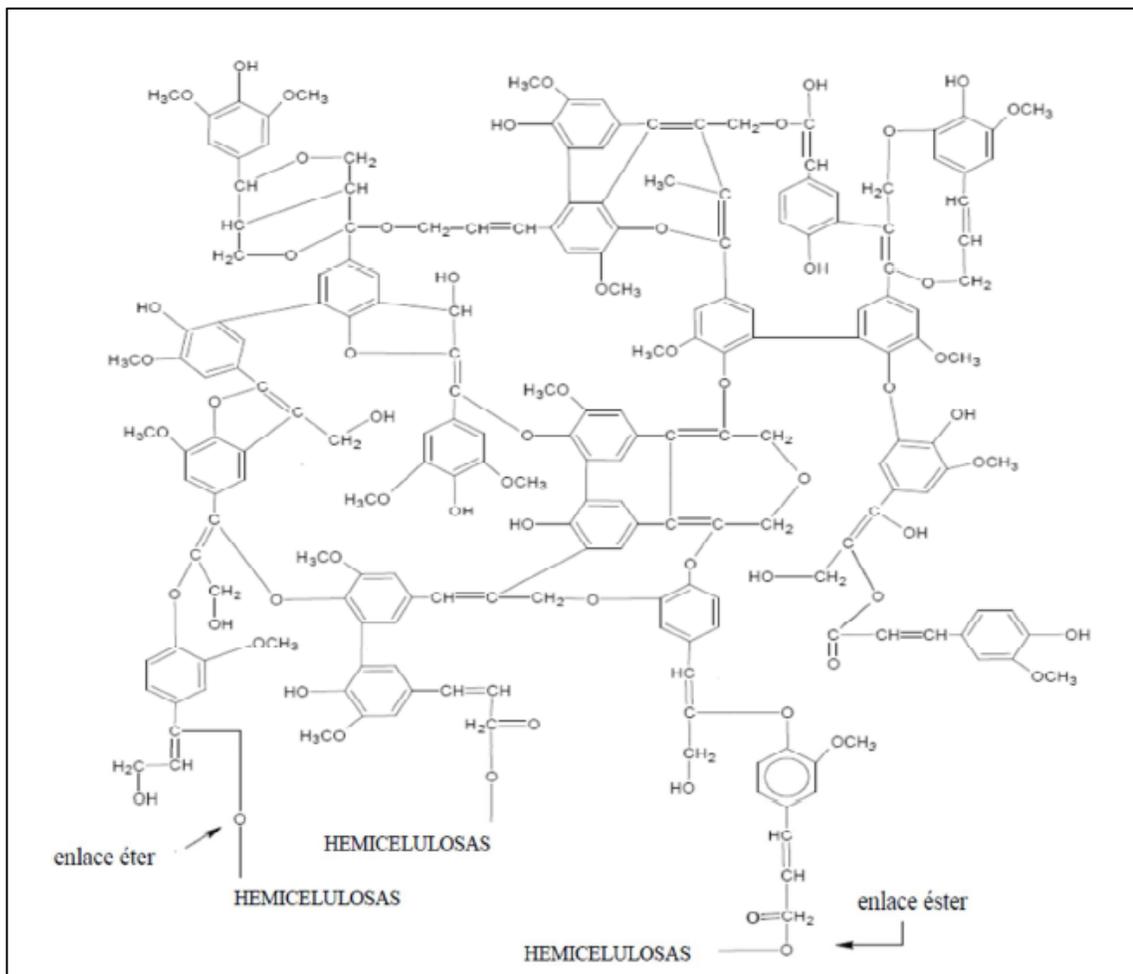
El xiloglucano es el polisacárido más importante en residuos vegetales de mono y dicotiledóneas. El esqueleto del xiloglucano es idéntico al de la celulosa pero unido principalmente a residuos de xilosa y en menor cantidad a moléculas de galactosa, arabinosa y mucosa.



**Figura 2:** Arabinoxilano característico de la hemicelulosa de la paja de trigo (Tomás, 2010).

### 2.3.3. Lignina

La lignina, junto con la celulosa y la hemicelulosa es el principal componente de las plantas y la forma más abundante de carbono en la biosfera. La lignina es un polímero tridimensional amorfo muy heterogéneo, de naturaleza no polisacáridica que está constituida por unidades de fenilpropano unidas por distintos tipos de enlace. Dada su compleja y heterogénea estructura hacen que sea un polímero difícilmente degradable (Kirk y Farrel, 1987). Se forma por deshidrogenación enzimática de los alcoholes cumarílico, coniferílico y sinapílico seguida por una polimerización, que al no estar controlada enzimáticamente y dado que los radicales pueden reaccionar unos con otros en una variedad de formas, hace que dicho polímero no tenga una forma única. La lignina contiene subestructuras fenólicas (con grupos hidroxilos fenólicos en el anillo aromático) y no fenólicas, aunque autores como Geng y Li (2002) han descrito que el 90% de la lignina natural son subestructuras no fenólicas: Mientras tanto, otros sugieren que la presencia de lignina en las plantas se debe a la ausencia de mecanismo excretorio, de forma que esta no sería más que una forma de detoxificación de sustancias fenólicas. Finalmente, cabe mencionar que la lignina se considera una importante precursora de las sustancias húmicas del suelo, teniendo un papel trascendental en el ciclo del C.



**Figura 3:** Estructura aproximada de la lignina en la paja de trigo (Tomás, 2010).

### 2.3.4 Pectina

La pectina es un polisacárido con una estructura compleja constituido fundamentalmente por cadenas lineales de moléculas de ácido D-galacturónico, que unidas entre sí constituyen el ácido poligalacturónico y además llevan entremezcladas moléculas de ramnosa, arabinosa, galactosa, xilosa, mucosa o ácido glucorónico. De acuerdo a lo estudiado por Botella et. al. (2004) la mayoría de los residuos agroindustriales contienen pectina, la cual usan como fuente carbonada diversos microorganismos.

## **2.4 Hongos saprobios en el suelo**

El papel de mayor relevancia que desempeñan los hongos saprobios en el suelo radica en la descomposición de la MO, siendo esenciales en la movilización, almacenamiento y liberación de nutrientes a partir de material vegetal disponible en la superficie terrestre. Según lo descrito por Lahdesmaki y Piispanen (1988) estos hongos intervienen en los procesos de descomposición de la MO del suelo por medio de degradaciones enzimáticas aunque llevan a cabo reacciones de condensación de esta materia originando la formación del complejo húmico

## **2.5 Hongos saprobios de la madera**

Dentro de este grupo se encuentran los hongos saprobios de podredumbre blanda, parda y blanca que se caracteriza por crecer en la madera y provocar su pudrición. Los hongos de podredumbre blanda y parda atacan fundamentalmente a la celulosa, mientras que los hongos de podredumbre blanca a la celulosa y lignina.

### **2.5.1 Hongos de la podredumbre blanda.**

Estos hongos atacan poco o nada a la lignina aunque sí a la celulosa y hemicelulosa por lo que surgen en las etapas más tempranas del proceso de pudrición de la madera. Requieren una fuente de nitrógeno alta para producir la podredumbre que generalmente obtiene el suelo. Se conocen unos 300 géneros de hongos de la podredumbre blanda pertenecientes a los Ascomicetes y Deuteromicetes entre los que destacan *Cephalosporium*, *Acremonium* y *Paecilomyces* (Aranda, 2006).

### **2.5.2 Hongos de podredumbre blanca**

Los hongos de la podredumbre blanca son un grupo ecofisiológicamente muy diverso, pertenecientes, la mayoría a los Basidiomicetes y en menor representación a los Ascomicetes. Estos hongos se caracterizan por degradar preferentemente a la lignina y acumular celulosa y hemicelulosa, lo que le da a la madera un aspecto blanquecino al que debe su nombre (Pointing, 2001). La habilidad para degradar lignina por estos hongos se asocia con la liberación de enzimas extracelulares como la lignina peroxidasa, manganeso peroxidasa y la lacasa, así como oxidasa que generan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> necesario para la actividad peroxidasa (Hatakka, 1994; Tuor et al, 1995).

### **2.5.3 Hongos de podredumbre parda**

Estos hongos degradan fundamentalmente compuestos celulósicos y hemicelulósicos provocando una despolimerización de estos polisacáridos y en los residuos lignocelulósicos generando una acumulación de lignina oxidada que representa una fuente potencial de compuestos aromáticos en la MO del suelo y da lugar a un color pardo al que debe su nombre (Buswell y Odier, 1987). De los hongos de podredumbre de la madera estos son los menos numerosos representando un 7%. De este fragmento pertenecen todos ellos al grupo *Basidiomicetes* y destacan géneros como *Fomes* o *Poria* (Eriksson et al., 1900).

### **2.5.4 Hongos que tiñen la madera**

Este grupo de hongos está integrado por una serie de ascomicetos (*Ophiostoma*, *Ceratocystis* entre otros) y deuteromicetos (*Aureobasidium*, *Phialophora*, *Trichoderma*, entre otros) que degradan principalmente lípidos, azúcares y almidón de la madera, con una mínima degradación de la lignina. La madera degradada adquiere diferentes colores, normalmente negro en maderas de angiospermas y azul en el caso de gimnospermas (Valles, 2006).

## **2.6 Sustancias húmicas.**

Desde el punto de vista geológico, las sustancias húmicas son los intermediarios químicos entre las plantas y los fósiles, son el último producto de descomposición natural aeróbica de toda materia viviente en presencia de agua. Para que el proceso de humificación se lleve a cabo, se requiere que los restos de plantas y animales sean digeridos de manera sucesiva por al menos tres especies diferentes de microorganismos apropiados, lo que culmina en la formación de una de las sustancias naturales más complejas de la Tierra, por lo que la naturaleza química de los suelos, de los pantanos y de los sedimentos varía según la transformación y degradación que haya sufrido la MO de la que proviene (Schnitzer y Khan, 1972).

Sprengel en 1839 realizó el primer estudio sobre el origen y naturaleza química de las sustancias húmicas (Stevenson, 1982), y en ese mismo año Berzelius, investigador de origen sueco, contribuyó de manera significativa al conocimiento de este tipo de sustancias al aislar dos tipos diferentes de sustancias húmicas, ambas de color ligeramente amarillo, a partir de agua mineral y barro limoso rico en óxidos férricos (Steinberg, 2003).

### **2.6.1 Composición de las sustancias húmicas**

En cuanto a la composición elemental de las sustancias húmicas, los estudios realizados demuestran que la mayoría de los elementos que la conforman son carbono C, O, N, H y S, los que están presente independientemente en el país o continente en el que se originaron (Gajdosova et.al., 2001).

### **2.6.2 Propiedades y aplicaciones de sustancias húmicas.**

Tanto los ácidos húmicos como los ácidos fulvicos son de gran importancia en los cultivos, ya que evitan que las tierras se compacten, incentivan la transferencia de nutrientes suelo-planta, mejoran la capacidad de retención de agua, incrementan la velocidad de germinación de las semillas y estimulan la proliferación de la microflora presente en el suelo (Senesi et. al., 1991).

Las sustancias húmicas forman sales con cationes de metales alcalinos y alcalinotérreos, así como con algunos otros metales, dando origen a humatos y fulvatos. Algunos de ellos son de alto valor nutricional para las plantas ya que vuelven solubles y asimilables a los metales.

Los ácidos fulvicos son moléculas poco polimerizadas con grandes cantidades de grupos carboxílicos, hidróxidos, aminas, unos cuantos anillos aromáticos y cadenas laterales alifáticas de gran longitud. Estos grupos reactivos les proporcionan un carácter global ácido y una elevada capacidad de intercambio catiónico, por lo que no solo la roca madre que conforma la arena del suelo es la responsable de este fenómeno. En un suelo, a mayor intercambio catiónico, mayor es la capacidad y disponibilidad de nutrientes, y por consiguiente mayor su fertilidad, además de que se evitan precipitaciones o bloqueos indeseables de los nutrientes (Stevenson, 1982). De esta manera la principal labor de las sustancias húmicas en el medio ambiente es complejar y remover metales, sustancias químicas orgánicas de origen antropogenico y otros contaminantes de las aguas.

### **2.6.3 Efectos de las sustancias húmicas sobre el suelo**

De acuerdo a lo estudiado los ácidos húmicos y fulvicos ejercen una serie de mejoras físicas, químicas y biológicas en los suelos, que conducen finalmente a un incremento en la productividad y fertilidad de este (Tradecop, 2001)

#### **2.6.3.1 Efectos físicos sobre el suelo**

Algunas de las posibles mejoras físicas son favorecer la formación de agregados estables actuando de forma conjunta con arcillas y humus, mejorando la estructura del suelo (Tisdale y Nelson, 1966). De esta forma dan mayor cohesión en suelos arenosos, y la disminuyen en suelos arcillosos (Tan y Nopamombodi, 1979). Por otra parte según lo estudiando por Landeros (1993) las sustancias húmicas son las responsable de dar un color oscuro al suelo, provocando un aumento de su temperatura.

### **2.6.3.2 Efectos químicos sobre el suelo**

Según lo concluido por Landeros (1993) y afirmado por Guerrero (1999), las sustancias húmicas en el suelo elevan la capacidad de intercambio catiónico al unirse con las arcillas generando el complejo arcillo – húmico. También forman complejos con el P, manteniendo a éste en un estado asimilable por la planta.

Las sustancias húmicas aumentan significativamente la capacidad de tampón de los suelos, es decir, que para producir cambios en el pH del suelo se necesitan cantidades elevadas de ácidos o bases (Bollo, 1999). Además, su acción quelante contribuye a disminuir los riesgos carenciales y favorece la disponibilidad de algunos micronutrientes para la planta.

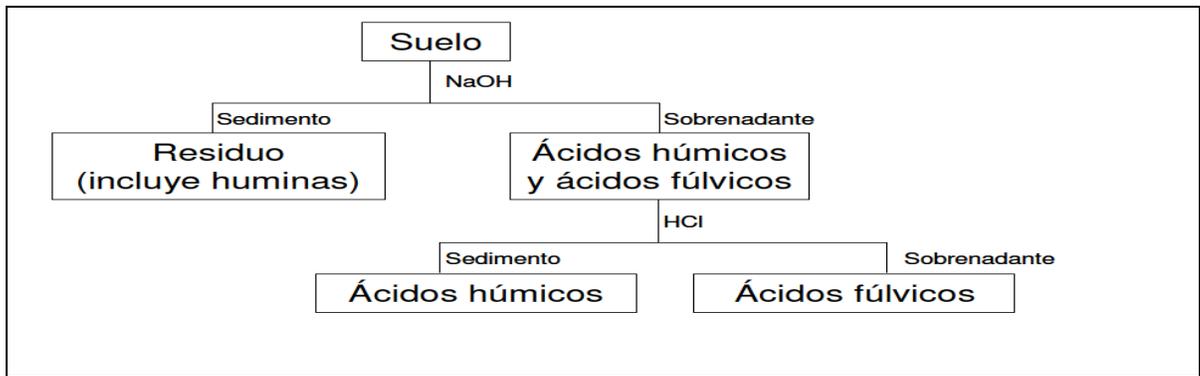
El humus es una fuente de gas carbónico que contribuye a solubilizar algunos elementos minerales, con lo que facilita su absorción por parte de la planta (Tisdale y Nelson, 1966)

### **2.6.3.3 Efectos biológicos sobre el suelo.**

Sobre la biología del suelo Bellapart (1999) ha reportado que las sustancias húmicas son una importante fuente de hidratos de carbono para los microorganismos del suelo, por lo que favorece el normal desarrollo de cadenas tróficas en el suelo (Bollo, 1999).

### **2.6.4 Proceso de extracción y purificación de sustancias húmicas.**

La clasificación de sustancias húmicas conocidas hasta la fecha (ácidos húmicos, ácidos fulvicos y huminas) fue hecha con respecto a sus solubilidad (Kononova, 1966). Los dos tipos de ácidos representan las fracciones solubles en soluciones acuosas alcalinas, mientras que las huminas representan el residuo insoluble del humus. Los ácidos fulvicos son separados de los ácidos húmicos a través de la precipitación de estos últimos, lo cual se logra mediante la acidificación de la solución acuosa en la que se encuentran disueltos. Los ácidos fulvicos son solubles a cualquier pH por lo que permanecen disueltas en el medio acuoso.



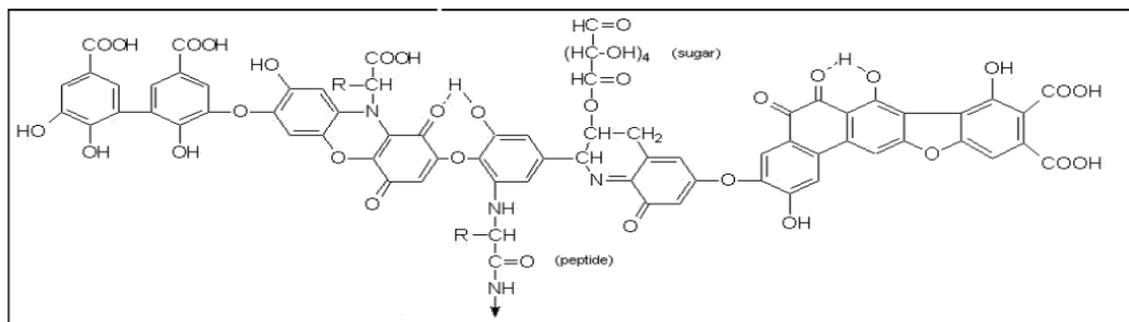
**Figura 4:** Proceso de separación de ácidos fulvicos, ácidos húmicos y huminas con base a sus solubilidades en medios alcalinos y/o ácidos (Melo, 2006).

### 2.6.5 Clasificación de sustancias húmicas.

Gracias a los estudios realizados en la última década y siguiendo los criterios de Kononova (1966) las sustancias húmicas se pueden fraccionar en los grupos descritos a continuación.

#### 2.6.5.1 Acido húmico

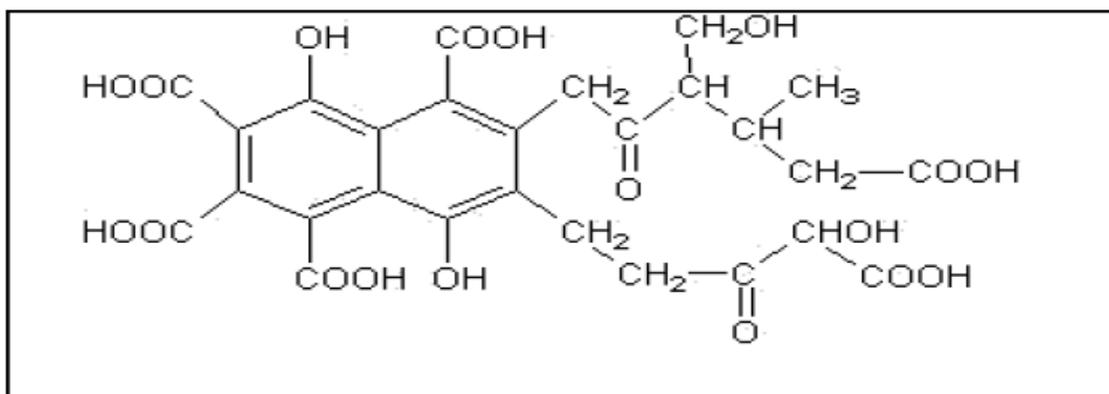
El ácido húmico es soluble en una solución alcalina pero precipita cuando se acidifica el extracto. Es de color café oscuro, de alto peso molecular (5.000 – 300.000 dalton) este ácido está íntimamente ligado a las arcillas, es resistente a la degradación y está altamente polimerizado. Este contiene alrededor de 50 a 62% de carbono (Florenza y Martínez, 1991)



**Figura 5:** Estructura química del ácido húmico (Stevenson, 1982).

### 2.6.5.2 Acido fulvico.

Los ácidos fulvicos son moléculas de bajo peso molecular extremadamente complejas, solubles en agua, ya sea a pH ácido o básico; su estructura molecular le confiere sus raras propiedades y naturaleza bioactiva. Es de color pardo-amarillento, de menor peso molecular que la sustancia anteriormente descrita (900 – 5000 dalton) y posee cerca de 43 a 52 % de carbono (Florenza y Martínez, 1991; Bollo, 1999).



**Figura 6:** Estructura química del ácido fulvico (Buffle, 1977)

### 2.6.5.3 Huminas

Las huminas constituyen la parte no soluble, y por lo tanto no extraíble de las sustancias húmicas (Bollo, 1999). Esta fracción de MO es la de mayor peso molecular.

## 2.7 Composición elemental de las sustancias húmicas

Las sustancias húmicas, ya sean ácidos húmicos, fulvicos o huminas se componen principalmente por carbono, hidrogeno, oxígeno y nitrógeno. En la siguiente tabla se presentan los porcentajes de composición obtenidos en materia seca y en ausencia de cenizas.

| Sustancias      | % (en base a material seco y sin cenizas) |           |         |           |
|-----------------|---|-----------|---------|-----------|
|                 | C   | H         | O       | N         |
| Acidos Húmicos  | 52 - 62                                   | 3,0 - 5,5 | 30 - 35 | 3,5 - 5,0 |
| Acidos Fúlvicos | 44 - 49                                   | 3,5 - 5,0 | 44 - 49 | 2,0 - 4,0 |
| Huminas         | 54 - 65                                   | 3.2 - 7.6 | 28 - 32 | 2.0 - 4.2 |

**Figura 7:** Composición elemental SH (David 2008).

## 2.7 Estabilización de la materia orgánica en el suelo.

Conviene distinguir el proceso de estabilización de la MO, del proceso de acumulación de la MO. Esta se acumula cuando se producen condiciones que inhiben la descomposición de la misma, tales como un exceso de humedad, temperaturas muy bajas, distrofia, presencia de toxinas, etc. Estas condiciones son típicas en Histosoles (suelos orgánicos), pero también se producen en otro tipo de suelos, como es el caso de determinados horizontes O de suelos muy ácidos (Podzoles, Umbrisoles) u otros suelos con acuíferos muy altos (ñadis en suelos andisoles). Esta MO suele ser muy poco estable debido a que apenas ha tenido lugar un proceso de humificación, y es susceptible de descomponerse si las condiciones que inhiben este proceso se invierten. Por otro lado, el proceso de estabilización de la MO se da por la inherente recalcitrancia de los compuestos orgánicos, por la interacción de la MO con las superficies reactivas de la fracción mineral del suelo (Oxi-hidróxidos de Fe y Al, aluminosilicatos) o simplemente por la inaccesibilidad de la MO para los microorganismos (von Lutzow et al., 2006).

## 2.8 Aporte del estudio a un desarrollo sustentable.

Como contribución del estudio a un desarrollo sustentable, se observa un aporte en la búsqueda de nuevas herramientas y técnicas que reduzcan de manera considerable el deterioro de los suelos, presentando una opción para manejar residuos que en la actualidad simplemente no se utilizan, generando problemas y peligros al momento de ser eliminados. En este contexto, la

aplicación de hongos como los anteriormente descritos, junto a distintos estabilizantes abióticos, como el  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  y el propio suelo, que pudiese contener cantidades importantes de alofán, que es conocido por estabilizar fuertemente la MO (Calabi-Floody et al., 2011), pueden ser una alternativa eficiente en el manejo de residuos, incrementando la fertilidad del suelo y mejorando de manera considerable el desarrollo de las plantas.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

En la primera parte del estudio, anterior a la elaboraciones de las unidades experimentales se multiplicaron y produjeron inóculos de los siguientes hongos autóctonos: *Trametes versicolor* (L) Lloyd, *Trichoderma harzianum* (Rifai), *Pleurotus ostreatus* (Jacq) P. Kumm y *Coriolopsis rigida* (Beck&Montt). Este procedimiento se realizó en medios de cultivo inertes, los que posteriormente fueron incorporados a las unidades experimentales.

#### 3.1 Cultivo de los hongos en placa.

El medio de cultivo seleccionado fue Saboureaud, con un pH ajustado a 5,6. Este medio fue inoculado con trozos de placas madres de los hongos antes mencionados provistas por el laboratorio de Biorremediación de la Universidad de La Frontera. Por su parte, el hongo *Pleurotus ostreatus* fue obtenido desde trozos de carpóforo de producción comercial. Para preparar el medio de cultivo, a un litro de agua destilada se le incorporaron:

1. 65 g de reactivo Saboureaud en polvo; 0,5 g de sulfato de magnesio; 0,5 g de fosfato dihidrogeno de potasio; 0,16 g de sulfato de hierro y 0,2 µg de tiamina.
2. Se ajustó el pH de la solución hasta llegar a 5,6.
3. Se esterilizó el medio mediante autoclavado por 20 minutos a 121 °C.
4. Posteriormente, bajo una cámara de flujo laminar se procedió a extender el medio en placas de Petri, aplicando unos 30 ml en cada placa, y se dejó solidificar.
5. A continuación se inocularon con trozos de placas de los hongos seleccionados.
6. Luego, se incubaron todas las placas a una temperatura constante de 28°C por 10 días.
7. Una vez que las placas fueron totalmente colonizadas por el hongo se refrigeraron a una temperatura de 4 °C hasta su incorporación a las unidades experimentales.

### **3.2 Unidades experimentales**

Cada unidad experimental estuvo compuesta por cañas de postcosecha de trigo obtenida de cultivos realizados en la región de La Araucanía. Éstas fueron trituradas hasta una longitud final de 2-4 cm. Se llevó a cabo posteriormente un proceso de desinfección, aplicando vapor de agua por 30 minutos seguidos a una temperatura relativamente constante de aproximadamente 70° C. Una vez realizado este proceso, las cañas se dispusieron en bolsas de poliestireno y fueron inoculadas con inoculantes líquidos de los hongos seleccionados. Cada unidad poseía una masa húmeda de 1,4 kilogramos del material descrito anteriormente, luego se les agregó un sistema de respiración compuesto por un tubo de PVC de 5 cm de diámetro con una serie de agujeros en la parte inferior del tubo, al cual en el extremo superior se le agregó un algodón y un trozo de gasa para disminuir el ingreso de agentes contaminantes a la unidad, a la vez que se propiciaba la mantención de las condiciones aeróbicas necesarias para la colonización del hongo sobre el sustrato final. Cada unidad contenía una humedad relativa de un 35% aproximadamente.

La inoculación se realizó disgregando las placas Petri que contenían los aislados de cada hongo en un sistema de licuación, aplicándole 400 ml de agua estéril. Una vez homogenizada la solución, se le agregaron 200 ml por unidad. Finalmente se dispusieron en un invernadero, a 24°C en condiciones de oscuridad.

### **3.3 Diseño experimental**

Se realizaron 48 tratamientos, 12 por cada hongo seleccionado. A cada hongo se le aplicaron tres estabilizantes abióticos y se mantuvo un control sin aplicación de estabilizante. Esta aplicación se realizó tres veces en tiempos distintos: i) la primera aplicación fue a las 2 semanas desde su inoculación, ii) la segunda, a las 10 semanas y iii) la última a las 16 semanas de iniciado el proceso de compostaje. Los estabilizantes aplicados fueron; óxido de hierro ( $Fe_2O_3$ ), óxido de aluminio ( $Al_2O_3$ ) y suelo con una alta proporción de materiales alofánicos, provenientes del horizonte de transición B/C de la serie Pemehue (Pitrufquen, región de La Araucanía). A continuación se especifican las dosis de cada aditivo aplicado.

| <b>Estabilizante abiótico</b> | <b>Masa (g)</b> |
|-------------------------------|-----------------|
| Óxido de Hierro               | 20,6            |
| Oxido de Aluminio             | 20.8            |
| Suelo Alofánico               | 146             |

**Cuadro 1:** Cantidad en gramos de estabilizantes aplicados a cada unidades.

### **3.4 Muestreo**

Los muestreos a las unidades experimentales se realizaron cada 14 días, donde se extraían aproximadamente 40 gramos desde cada unidad experimental para realizar las lecturas que serán descritas más adelante. Al cabo de 14 días de su inoculación se extrajeron las primeras muestras, rotuladas como tiempo cero, coincidiendo con la primera aplicación de estabilizantes químicos. Se realizaron 10 muestreos a lo largo de todo el proceso experimental. Para este estudio se seleccionaron los datos, de los muestreos realizados los días 14, 30, 60, 90, 120 y 150.

### **3.5 Índices de humificación.**

Para realizar las lecturas de los índices de humificación de las unidades experimentales, se procedió a tomar tres réplicas de 0,5 gramos de cada una de las 48 unidades experimentales preparadas, para ser secadas en una estufa por 24 horas con el fin de lograr obtener el porcentaje de humedad, y determinar la cantidad de solución de hidróxido de sodio a aplicar.

#### **Procedimiento:**

1. Una vez realizada la determinación de humedad, las muestras se traspasaron a tubos de tipo falcon de 50 ml y se aplicaron 16,25 ml de NaOH 0,5 M.
2. Posteriormente, se agitaron todas las réplicas por 16 horas continuas en un agitador orbital.

3. Luego, se dejaron reposar 2 horas continuas para ser centrifugadas por 25 minutos a 1600 rpm.
4. Una vez terminado este proceso se tomó 1,5 ml del sobrenadante de cada tubo y se dispuso en cubetas de 2 ml.
5. Por último, se realizaron dos lecturas espectrofotométricas por cada cubeta: la 1° lectura se determinó a una absorbancia de 472 nm, y la 2° lectura se determinó a una absorbancia de 664 nm.

### **3.6 Extracción de sustancias húmicas**

Para llevar a cabo el proceso de extracción y separación de las sustancias húmicas se tomaron 15 gramos de sustrato de cada una de las 48 unidades experimentales descrita anteriormente. Posteriormente se aplicaron 150 ml de NaOH 0,5 M. Las unidades se dispusieron en un agitador orbital por 16 horas continuas a una velocidad de 180 rpm. Una vez agitadas las muestras, se separó el material sólido (paja) de líquido mediante diversas membranas filtradoras. Una vez recuperada la fracción líquida, en el frasco se procedió a aplicar una dosis variable de HCl 4 M, con el fin de reducir el pH (bajo 2) para que la muestra quedara dentro de valores en los cuáles precipitaran los ácidos húmicos, y los ácidos fúlvicos quedaran como sobrenadante. Luego se dividió el contenido de cada frasco en 4 tubos tipo fálcon, los que fueron centrifugados por 5 minutos, para lograr un nivel óptimo de separación de ácidos. Finalmente se separaron manualmente los ácidos húmicos de los fulvicos, para su almacenamiento en condiciones de frío (-80°C) hasta el momento de su análisis.

Con el objetivo de caracterizar las muestras de compost y ácidos húmicos (HA), estas fueron trasladadas al Laboratorio de Isotopos Estables de la Universidad de Ottawa, Canadá. El análisis se llevó a cabo utilizando un analizador elemental (Vario EL III Analizador Elemental).

#### **Procedimiento:**

Con el objetivo de determinar los principales grupos funcionales fueron realizados los siguientes procesos:

1. Para el hidrogeno activo y la acidez total, las muestras fueron tratadas con un exceso de la solución de Ba(OH)<sub>2</sub> por 24 horas. El Ba(OH)<sub>2</sub> restante tras la reacción fue titulado con un ácido estándar (Wright y Schnitzer , 1959 ).
2. Los grupos carboxílicos fueron estimados con un exceso de la solución de Ca(OAc)<sub>2</sub> para esto el material húmico (MH) se agito por 24 horas con la solución de Ca(OAc)<sub>2</sub>. El ácido acético liberado fue titulado con una solución estándar de NaOH (Wright y Schnitzer, 1959).
3. Los grupos fenólicos OH fueron determinados con la siguiente formula:

$$\text{Acidez total (meq/g MH)} - \text{Grupos carboxílicos (meq/g de MH)} = \text{Grupo fenólico OH}$$

### 3.7 Análisis estadístico

Para el análisis de los datos obtenidos en el proceso experimental se utilizaron distintas técnicas estadísticas que se describen a continuación. Para esto se utilizó el software estadístico SPSS v. 10.0.

**3.7.1 Análisis de la varianza unifactorial:** Los datos obtenidos para las distintas etapas de muestreo, se evaluaron mediante un análisis de la varianza de una vía, con el objetivo de analizar el efecto de las distintas situaciones de partida sobre el comportamiento de la variable de respuesta en un momento puntual del estudio. Cuando  $p < 0.05$  se realizó la prueba post-hoc de Tukey para determinar la significación estadística de las diferencias obtenidas (Cornejo, 2006).

**3.7.2 Análisis factorial:** Las variables de respuesta obtenidas fueron analizadas por medio de ANDEVA de medias repetidas, y los promedios globales para cada unidad experimental fueron sometidos a un análisis factorial con extracción de componentes principales (CP). Dos CP que explicaban más del 80 % de la varianza total, fueron obtenidas y utilizadas posteriormente.

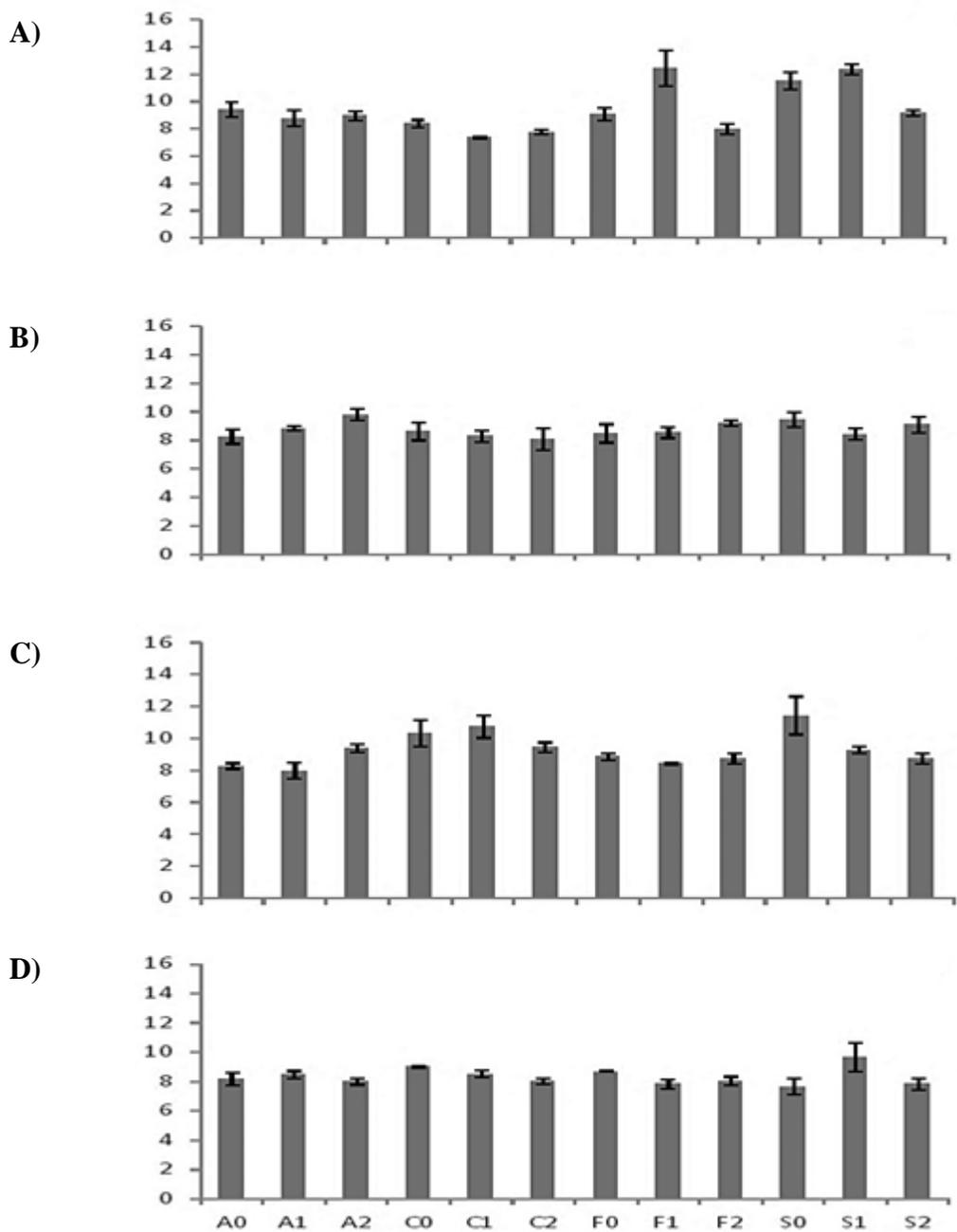
**3.7.3 Análisis de conglomerados:** Para realizar la clasificación de grupos que asocian datos relacionados se realizó un análisis de conglomerado no jerárquico. Esto permitió clasificar los distintos grupos de la variable influyente según el efecto que determinaron las distintas variables de respuestas. Como método aglomerativo se utilizó el vecino más lejano (Cornejo, 2006).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Índice de humificación hongo/aditivo químico.

En la figura 8 se presentan las medias globales de los índices de humificación (IH) para cada una de las especies de hongo inoculadas. Los valores más elevados entre los cuatro hongos se presentaron en *Coriolopsis rigida*. Específicamente, en la enmienda que contenía óxido de hierro ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ). Por el contrario, los valores más bajos los presentaron *Trametes versicolor* y una unidad aislada de *Coriolopsis rigida* específicamente en el control sin aditivos químicos en el día 70.

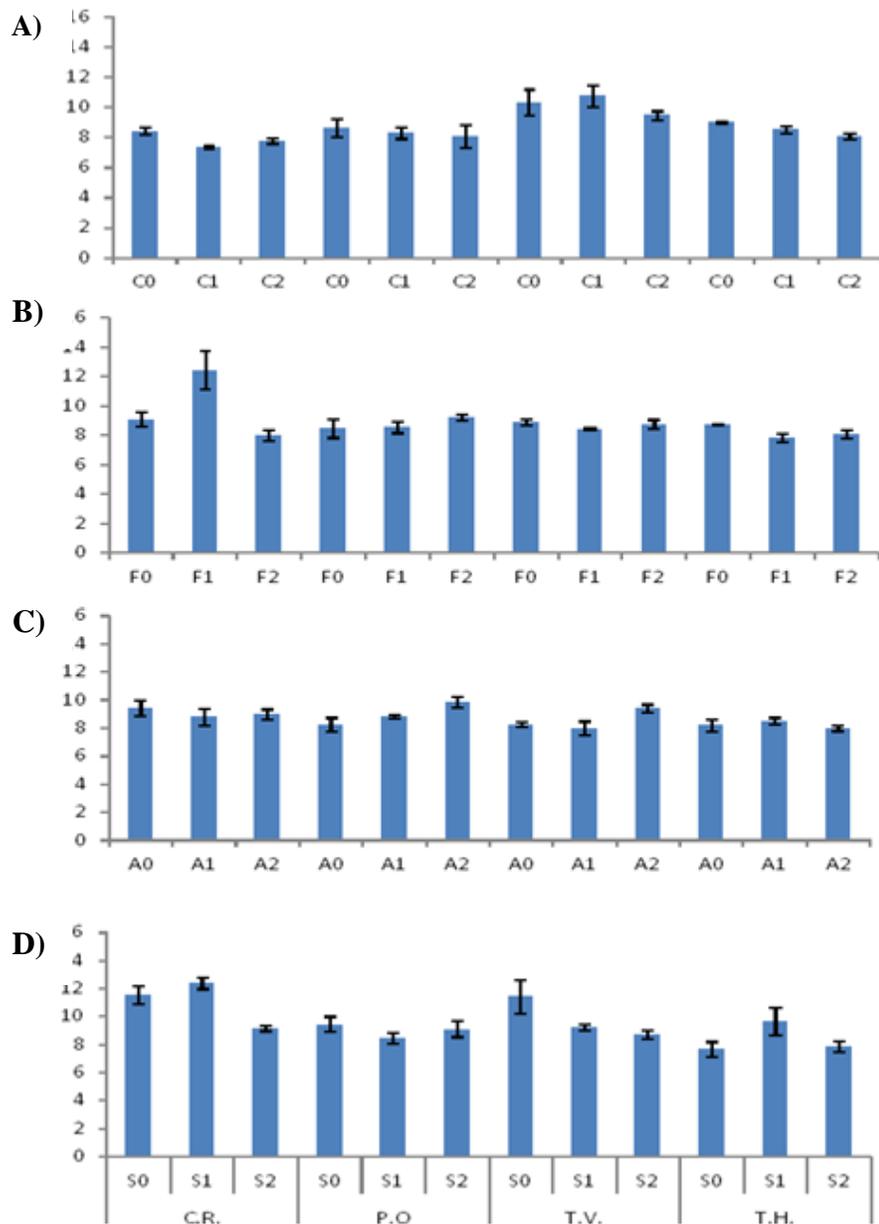
En términos generales *Coriolopsis rigida* produjo los mayores índices con  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  como aditivo, seguido de suelo aplicado el día 70, y suelo aplicado el día catorce. Al observar los aditivos que mostraron los más altos resultados en cada una de las especies fúngicas inoculadas se observó que, para *Coriolopsis rígida* el estabilizante con mayores aumentos en IH fue el  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  aplicado el día 70. Por su parte, el hongo *Trametes versicolor* mostro los mayores valores en el tratamiento con suelo aplicado en el tiempo dos (día 70), *Pleurotus ostreatus* en la enmienda a la cual se le aplicó  $\text{Al}_2\text{O}_3$  el día 112, y por último el hongo *Trichoderma harzianum* mostro mayores IH en el tratamiento con suelo aplicado el día 70.



**Figura 8:** Índices de humificación medios globales en un compostaje de paja de trigo inoculado con los hongos *Coriolopsis rígida* (A), *Pleurotus ostreatus* (B), *Trametes versicolor* (C) y *Trichoderma harzianum* (D), con utilización de aditivos químicos y distintos tiempos de aplicación del aditivo. Tratamientos: A0-óxido de aluminio aplicado día 14, A1-óxido de aluminio aplicado día 70, A2-óxido de aluminio aplicado día 112; C0-control día 14, C1-control día 70, C2-control día 112, F0-óxido de hierro aplicado día 14, F1-óxido de hierro aplicado día 70, F2-óxido de hierro aplicado día 112; S0 suelo Pemehue aplicado día 14, S1-suelo Pemehue aplicado día 70, S2-suelo Pemehue aplicado día 112.

## 4.2 Índices de humificación por tratamiento

En la figura 9 se presenta los IH respecto a los aditivos incluidos en cada tratamiento. En el grafico 9A se muestra la comparación de IH de las unidades utilizadas como control. Los índices más altos los mostró el hongo *Trametes versicolor* T1, y luego T0 (día 14). Los índices más bajos fueron generados por el hongo *C. rígida* T1, seguido por el mismo hongo tiempo dos. Los índices observados en este grafico presentar un rango de variación de un 31%. En la figura 9B se muestran los IH de las enmiendas adicionadas con óxido de hierro ( $Fe_2O_3$ ) como estabilizante. En este caso los IH más altos fueron alcanzados por las unidades inoculadas con; *C. rígida* T1 (día 70), *P. ostreatus* T2 (día 112) y *C. rígida* T0 (día 14). Los valores más bajos se observaron en *Tri. harzianum* T1, *C. rígida* T2 y *Tri. harzianum* T2. El rango de variación en este caso alcanzó 37%. En el grafico 9C se comparan las enmiendas a las que se les agregó óxido de aluminio ( $Al_2O_3$ ). Se observa que el hongo que alcanzó mayores IH fue *P.ostreatus* T2, seguido por *C. rígida* T0 (14 días). Los menores índices se presentaron en *Tra. versicolor* T1 y *Trichoderma harzianum* con  $Al_2O_3$  aplicado el día 112 (T2). El rango de variación de índices es de un margen del 18%. En el grafico 9D se presentan los resultados obtenidos para los tratamientos adicionados con suelo alofánico. Se observa que los índices más altos fueron presentados por *C. rígida* con suelo adicionado a los 14 y 70 días (T0 y T1), seguido de *Tra. versicolor* suelo T0, y los tratamientos que presentaron los menores valores fueron *P. ostreatus* T1 y *Tri. Harzianum* T2 y T0. En este caso el rango de variación alcanzo un 18%.



**Figura 9:** Índices medios globales organizados por tratamiento en un compostaje de paja de trigo por los hongos *Coriopsis rigida* (C.R.), *Pleurotus ostreatus* (P.O.), *Trametes versicolor* (T.V.) y *Trichoderma harzianum* (T.H.), con utilización de aditivos químicos y distintos tiempos de aplicación. Tratamientos: ; A 0-óxido de aluminio aplicado día 14, A 1-óxido de aluminio aplicado día 70, A 2-óxido de aluminio aplicado día 112; C 0-control día 14, C 1-control día 70, C 2-control día 112 F 0-óxido de hierro aplicado día 14, F 1-óxido de hierro aplicado día 70, F 2-óxido de hierro aplicado día 112; S 0 suelo Pemehue aplicado día 14, S 1-suelo Pemehue aplicado día 70, S 2-suelo Pemehue aplicado día 112.

### 4.3 Evolucion temporal de los IH

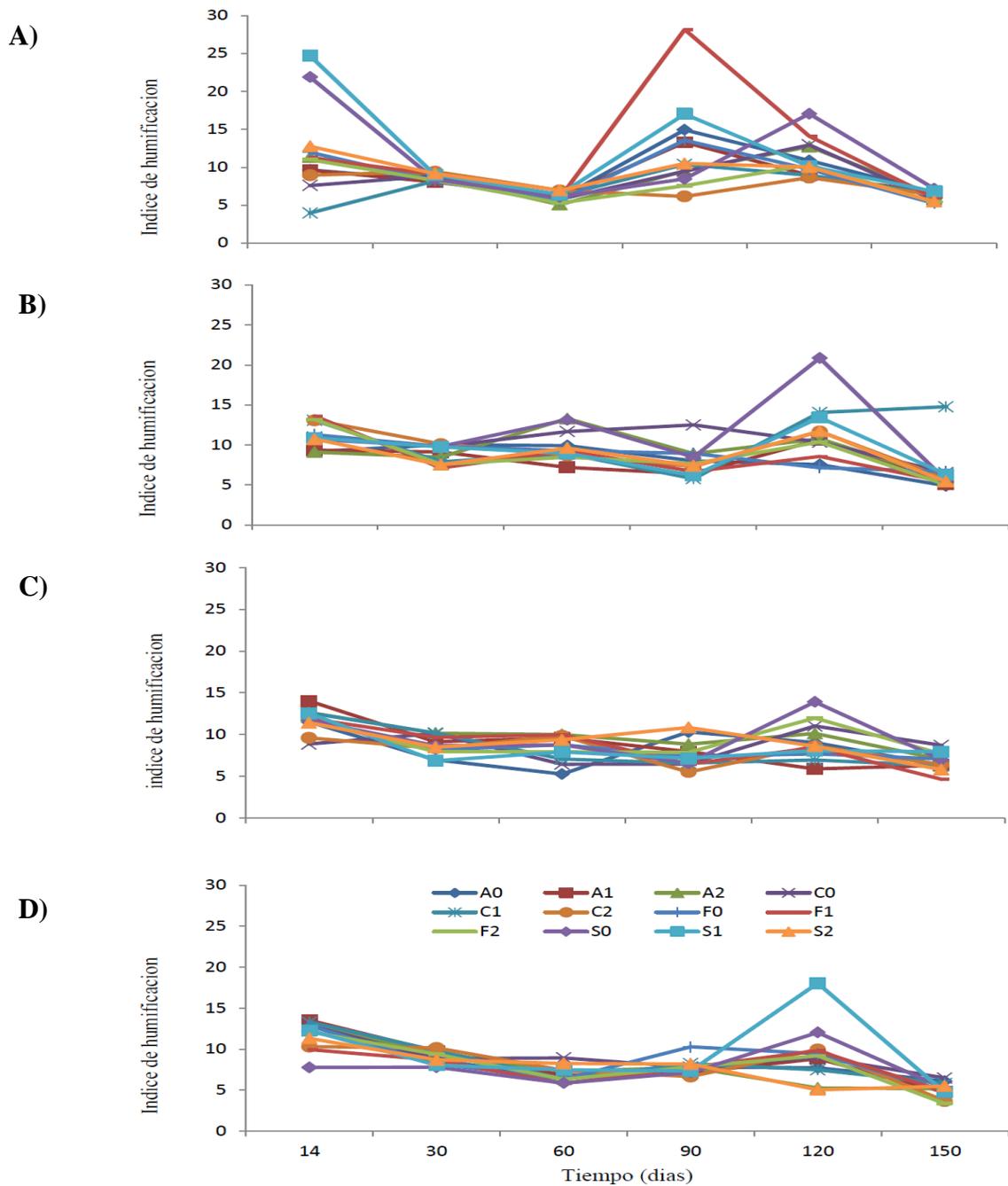
En la Figura 10 se presentan la evolución temporal de los índices de humificación a lo largo de todo el proceso de compostaje. Este tuvo una duración de 150 días desde la inoculación de las unidades con los hongos utilizados. En el gráfico 10A se observan los cambios en los índices en los tratamientos inoculados con *Corioloopsis rígida*. Este hongo mostró los mayores índices respecto a los otros tres hongos, especialmente, en los sistemas donde se usó como aditivo  $Fe_2O_3$  en T1 (día 90), suelo en T1(día 14) y suelo en T0 (día 70). En términos generales la tendencia de los valores de IH es regular, observándose desde el día 14 un descenso general de los índices hasta el día 60, donde se observa un aumento de los IH que se mantiene entre los días 90 y 120 aproximadamente, para luego volver a descender.

En la gráfica siguiente (B) se presentan los IH para las unidades inoculadas con *Trametes versicolor*. En este caso, el tratamiento que presentó mayores valores durante el proceso fue el que se adicionó con suelo en el tiempo 2 (día 120), seguido por el tratamiento control al T1. Los valores mínimos se observaron en el tratamiento que utilizó como aditivo óxido de aluminio en T1. De forma general, los índices presentaron regularidad en sus resultados con tendencia al descenso, demostrándose éste los días 30, 90 y 150, mientras que en los muestreos realizados los días 14, 60 y 120 se observó un aumento considerable.

El gráfico C presenta los resultados de los tratamientos inoculados con *Pleurotus ostreatus*. En términos generales se observa que los mayores valores se sitúan al inicio del proceso de estabilización. Específicamente en este punto (día 14) el tratamiento al que se le adicionó óxido de aluminio alcanzó el valor más alto. La tendencia general de aumento en los días 14, 60 y 120 se mantiene, aunque de manera menos marcada que en los demás hongos.

En el gráfico siguiente (D) se presentan los resultados para los IH en las enmiendas inoculadas con *Trichoderma harzianum* para todos los tratamientos. Específicamente, a la unidad a la que se le incorporó suelo el día 70 logró el valor más alto en el quinto muestreo, correspondiente al día 120. En este caso la tendencia se modifica de manera que los datos

comienzan un descenso que llega al día 60, donde se observa una pequeña alza hasta el día 120 para luego volver a decaer, a excepción del suelo en T2, que muestra una leve alza desde este ultimo intervalo de tiempo (120 a 150 días)



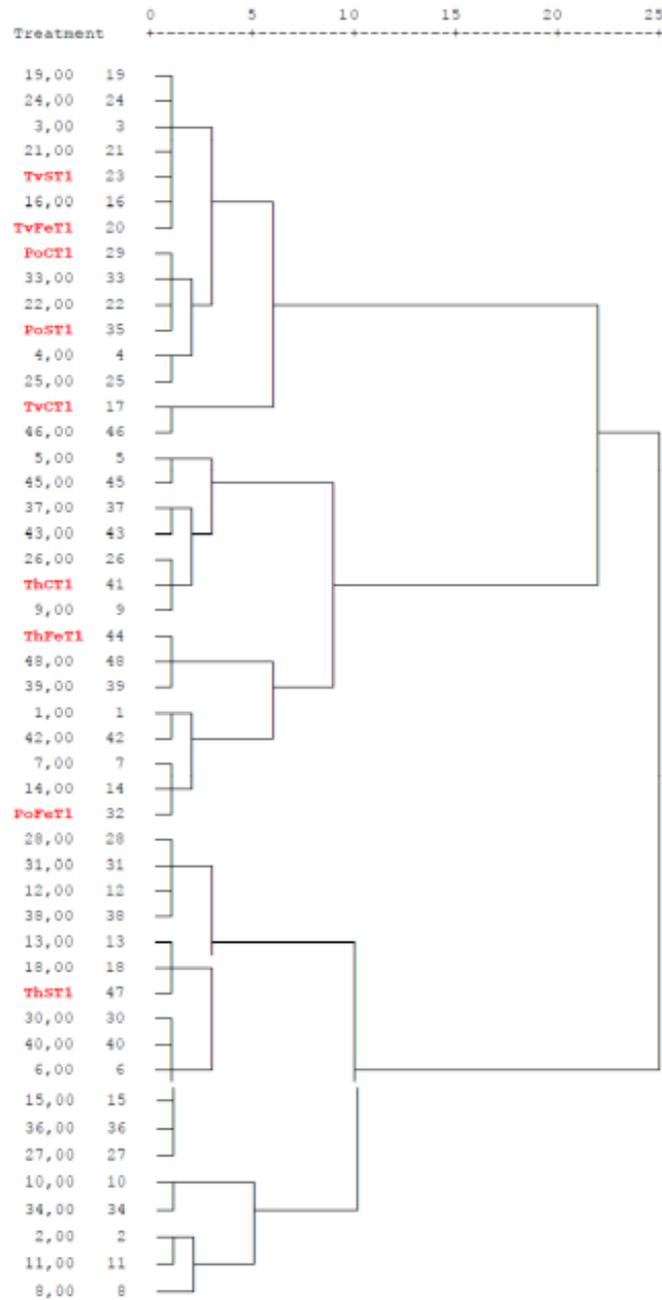
**Figura 10:** Evolución temporal de los índices de humificación en un compostaje de paja de trigo por los hongos *Corioloopsis rígida* (A), *Pleurotus ostreatus* (B), *Trametes versicolor* (C) y *Trichoderma harzianum* (D), con utilización de aditivos químicos y distintos tiempos de aplicación. Tratamientos: ; A 0-óxido de aluminio aplicado día 14, A 1-óxido de aluminio aplicado día 70, A 2-óxido de aluminio aplicado día 112; C 0-control día 14, C 1-control día 70, C 2-control día 112 F 0-óxido de hierro aplicado día 14, F 1-óxido de hierro aplicado día 70, F 2-óxido de hierro aplicado día 112; S 0 suelo Pemehue aplicado día 14, S 1-suelo Pemehue aplicado día 70, S 2-suelo Pemehue aplicado día 112.

#### 4.4 Análisis de correlaciones y componentes principales

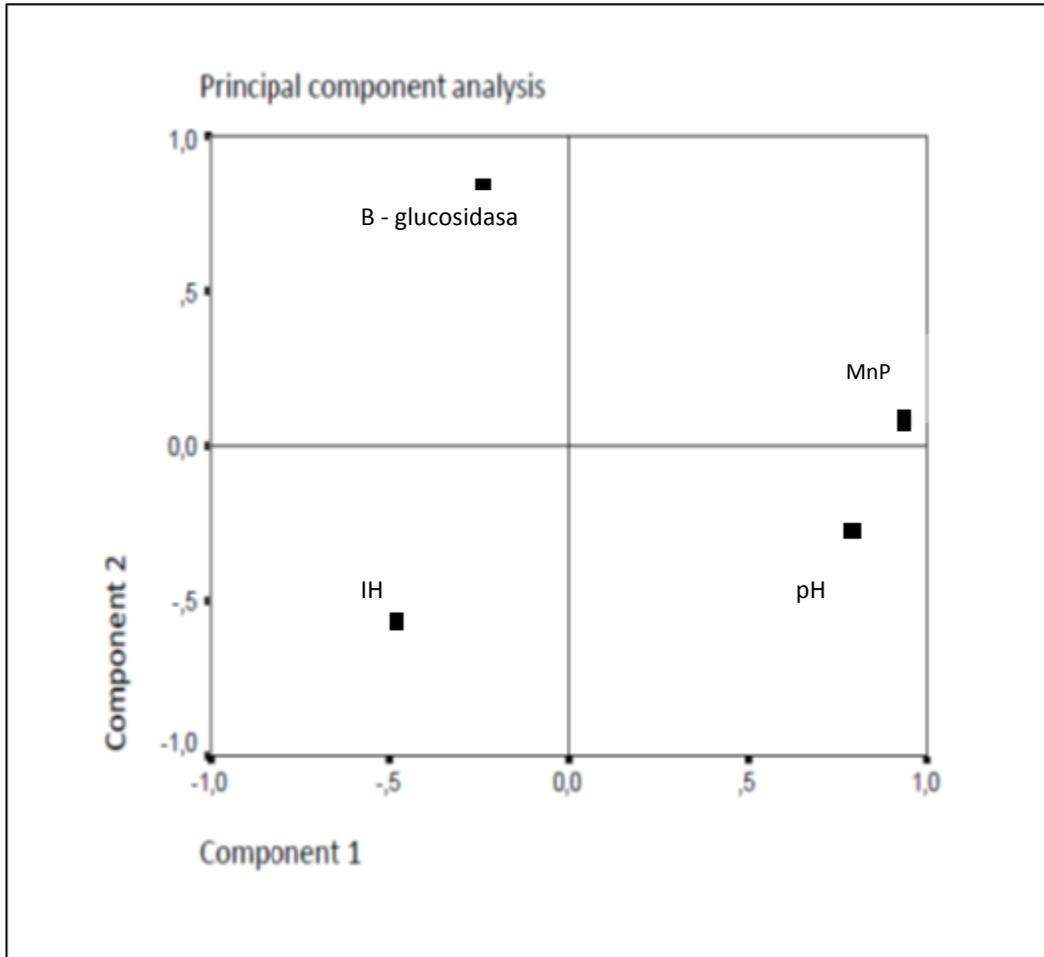
En la figura 10 se presentan los resultados para el análisis de agrupamiento jerárquico de las distintas combinaciones hongo/aditivo/tiempo utilizadas en este estudio. En el dendograma se observa la conformación de cinco grupos de tratamientos con características homogéneas. De este análisis se determinaron los tratamientos de mayor representatividad para finalmente realizar el análisis de grupos funcionales presentes en los tratamientos. La figura 10 muestra los grupos de mayor relación y los nueve tratamientos seleccionados, estos son; *Trametes versicolor-suelo T1* (TvST1), *Trametes versicolor-óxido de hierro T1* (TVFeT1), *Pleurotus ostreatus-control T1* (PoCT1), *Pleurotus ostreatus-suelo T1* (PoST1), *Trametes versicolor-control T1* (TvCT1), *Trichoderma harzianum-control T1* (ThCT1), *Trichoderma harzianum-óxido de hierro T1* (ThFeT1), *Pleurotus ostreatus-óxido de hierro T1* (PoFeT1) y *Trichoderma harzianum-suelo T1* (ThST1).

En la figura 11 se observa el análisis de componentes principales (CP), basado en las medias globales para cada parámetro en conjunto con resultados previos obtenidos por Orellana (2012), que consideran las determinaciones de diversas actividades enzimáticas. Se observaron altas correlaciones entre las enzimas ligninolíticas lacasa y MnP ( $r = 0,945$ ,  $p < 0,001$ ). Correlaciones significativas menores se obtuvieron entre pH y enzimas ligninolíticas ( $r = 0,642$ ,  $p < 0,001$  para la lacasa,  $r = 0,624$ ,  $p < 0,001$  para MnP). Por el contrario,  $\beta$ -glucosidasa y humificación ( $r = -0,050$  ns) fueron totalmente independientes y no presentan una correlación significativa con el resto de variables. Analizadas las correlaciones antes mencionadas son evidentes luego del análisis de CP en el que las variables lacasa, MnP se agrupan en el mismo cuadrante, y las otras variables se distribuyen de forma independiente.

De acuerdo con el análisis de CP y luego de agrupar todos los tratamientos por medio de análisis de conglomerados, se eligieron 9 tratamientos que cubren la mayoría de los grupos establecidos. Resalta en estos grupos el hongo *Trametes versicolor* con adición de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  como uno de los tratamientos que presentó mayores incrementos en las actividades de humificación.



**Figura 10:** Análisis de agrupamiento jerárquico y tratamientos seleccionados en rigor para la caracterización final, Los nueve tratamientos seleccionados, estos son; *Trametes versicolor-suelo T1*, (TvST1), *Trametes versicolor-óxido de hierro T1* (TVFeT1), *Pleurotus ostreatus-control T1* (PoCT1), *Pleurotus ostreatus-suelo T1* (PoST1), *Trametes versicolor-control T1* (TvCT1), *Trichoderma harzianum-control T1* (ThCT1), *Trichoderma harzianum- óxido de hierro T1* (ThFeT1), *Pleurotus ostreatus-óxido de hierro T1* (PoFeT1) y *Trichoderma harzianum-suelo T1* (ThST1).



**Figura 11:** Análisis de componentes principales relacionando las variables ph, humificación, lacasa y ,  $\beta$ -glucosidasa.

#### 4.5 Acidez total y grupos funcionales

En la figura 12 se muestran los resultados para acidez total y grupos funcionales obtenidos en las muestras seleccionadas a travez de analisis de conglomerado y componenetes principales mostrados anteriormente. La paja de trigo co-compostada con  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  e inoculada con *P. ostreatus* mostraron los valores más altos de acidez total (15,4 meq/g) y el grupo OH fenólico (14 meq / g) para los tratamientos de compost. Del mismo modo, la combinación de paja de trigo inoculado con *Tra. versicolor* y co-compostada con  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  mostraron un alto grado de acidez y contenido de grupos fenólicos. En comparación, la combinación de *Tri. harzianum* y  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  mostró los valores más bajos para las variables antes. De la misma manera, los acidos húmicos extraídos de la paja de trigo compostado mostraron los mayores valores de acidez total, grupo; fenólico y carboxílicos en *P. ostreatus* en presencia de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  (acidez total 16,5 meq/g; grupo carboxílico 2,3 meq/g; grupo OH fenólico: 14,1 meq/g) . *Tra. versicolor* adicionada con  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  mostró valores altos para los grupos funcionales ácidos. Debe tenerse en cuenta que la paja de trigo compost inoculado con las diferentes cepas de los hongos estudiados mostró un importante contenido de grupo fenólico en comparacion los grupos carboxílicos.

| Tratamientos | Acidez total | Grupo carboxílico | Grupo fenólico |
|--------------|--------------|-------------------|----------------|
|              | meq/g        |                   |                |
| CS THCT1     | 6,22 cd      | 0,80 abc          | 5,42 b         |
| CS THFET1    | 2,80 d       | 0,98 abc          | 1,82 b         |
| CS THST1     | 8,02 cd      | 0,53 bc           | 7,48 b         |
| CS TVCT1     | 4,17 cd      | 0,61 bc           | 3,56 b         |
| CS TVFET1    | 13,86 ab     | 0,36 c            | 13,49 a        |
| CS TVST1     | 14,96 a      | 0,90 abc          | 14,06 a        |
| CS POCT1     | 8,47 bc      | 1,74 a            | 6,73 b         |
| CS POFET1    | 15,40 a      | 1,40 ab           | 14,00 a        |
| CS POST1     | 8,20 de      | 1,28 abc          | 6,91 b         |
| HA THCT1     | 5,00 d       | 2,02 ab           | 2,98 e         |
| HA THFET1    | 6,29 cd      | 1,97 ab           | 4,31 de        |
| HA THST1     | 7,10 cd      | 1,36 b            | 5,74 bcde      |
| HA TVCT1     | 6,74 cd      | 1,61 ab           | 5,13 cde       |
| HA TVFET1    | 12,66 ab     | 2,29 ab           | 10,37 ab       |
| HA TVST1     | 10,45 bc     | 2,20 ab           | 8,25 bcd       |
| HA POCT1     | 12,30 ab     | 2,26 ab           | 10,03 abc      |
| HA POFET1    | 16,47 a      | 2,34 a            | 14,12 a        |
| HA POST1     | 9,18 bcd     | 1,35 b            | 7,82 bcde      |

**Figura 12:** Grupos funcionales en compost (CS) y en ácidos húmicos (HA) extraídos desde muestras de paja de trigo inoculadas con distintos hongos y con diversos aditivos.

## 5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De los resultados obtenidos en este estudio se puede resaltar los altos índices de humificación (IH) obtenidos por el hongo *Corioloopsis rígida*. Según lo descrito por Chen et. Al. (1977) los índices basados en la relación de densidades ópticas ( $E_4/E_6$ ) o IH son usados para conocer el grado de condensación de los constituyentes húmicos y como función directa del peso molecular de los compuestos obtenidos en el proceso de humificación. Por lo tanto, altos IH (>5) obtenidos por el hongo *Corioloopsis rígida* estarían relacionados con un mayor contenido de cadenas alifáticas y un menor peso molecular de los constituyentes húmicos. Es decir, que en relación a los otros hongos incluidos en este estudio, condiciones y tiempos generados, sería la especie fúngica menos eficiente en el proceso de humificación, o la que generó el proceso de forma más lenta.

Los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor* presentaron IH menores a *C. rígida*, lo que supone un aumento en el peso molecular y menor proporción de ácidos carboxílicos en los productos generados por estos hongos. Los resultados coinciden con otros estudios realizados por Coello (2011) y Llado (2012) que identifican a *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* y *Pleurotus spp.* como los hongos con mayor participación en procesos de degradación de residuos lignocelulosicos. Estos hongos poseen una marcada actividad ligninolítica como consecuencia de su maquinaria enzimática que permite la degradación de moléculas complejas y resistentes a la biodegradación. Cuando estas enzimas son secretadas por hongos saprofitos, la descomposición de la lignina y celulosa conduce a la formación de compuestos inestables, que pueden sufrir una serie de transformaciones durante el proceso de humificación (Grinhut et al., 2007). Sin embargo, la ruta seguida por cada producto de degradación es dependiente, también de otras condiciones de reacción tales como el pH, la humedad, conductividad eléctrica entre otros (Grinhut et al., 2007). En este sentido, estudios, realizados por Orellana (2012) y Medina (2013) mostraron que las enzimas lignocelulíticas presentes en los hongos utilizados para este estudio si bien generan compuestos precursores del proceso de humificación de la materia orgánica no cumplen un rol determinante

en este proceso, puesto que durante la cadena de reacciones participan mecanismos no enzimáticos que finalmente generan las sustancias de características húmicas (Glenn et al., 1983).

Otro aspecto relevante mostrado en este estudio es que los hongos estudiados degradan materiales lignocelulósicos que conduce a la formación de moléculas de bajo peso y otros compuestos químicamente inestables (por ejemplo, los radicales libres) como subproducto de la biodegradación, lo que produce altas relaciones  $E_4/E_6$ ; sin embargo, cuando se añaden óxidos metálicos como  $Al_2O_3$  y  $Fe_2O_3$  al proceso de compostaje, se observa un cierto efecto catalítico del proceso de humificación, así como una capacidad de agente complejante que determina la producción de moléculas con un mayor tamaño y peso molecular. Este aspecto, permitió la posterior clasificación de los tratamientos en 5 grupos homogéneos, de los cuáles algunos representantes de cada uno de ellos (9 tratamientos en total) fueron estudiados en mayor profundidad.

Por último, al analizar las concentraciones de los grupos funcionales presentes en los tratamientos seleccionados, se observó que los residuos de paja de trigo inoculado con *P. ostreatus* y *Tra. versicolor*, descritos como los principales productores de enzimas ligninolíticas, mostraron la mayor acidez total (incluso superiores a algunas descritas previamente para AH extraídos de suelo), y el mayor contenido de grupos OH, carboxílicos y fenólicos para ambos materiales estudiados (tanto el compost bruto como los AH extraídos). Cabe igualmente señalar que las sustancias húmicas extraídas de estos tratamientos mostraron una significativa proporción de OH fenólico. Lo anterior podría ser explicado debido a que estos participan en la síntesis de AH provenientes de fuentes fenólicas producidas en la descomposición de la lignina por los sistemas enzimáticos de los hongos saprobios utilizados (Grinhut et al., 2007). Además, algunas sustancias fenólicas producidas por microorganismos pueden haber sido utilizadas como hidratos de carbono para obtención de energía podrían dar cuenta de este aumento (Ghosh et al., 2011), o bien porque una parte del material extraído correspondió a carbono orgánico soluble co-extraído en el proceso de obtención de las sustancias húmicas, que influiría en el aumento de la proporción de OH fenólico.

## 7. RESUMEN

La incorporación de degradadores de materiales ricos en lignina y celulosa, ligado al uso de estabilizantes abióticos, surge como una alternativa potencial para el manejo de residuos de post cosecha de trigo, con el fin de obtener un material compostado para ser utilizado como enmienda en los suelos de carácter agrícola o como agente de restaurador de suelos degradados. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue analizar la evolución temporal de la humificación de residuos lignocelulóticos, como un indicador de la efectividad de determinados aislados de hongos saprobios y aditivos químicos como estabilizantes de compost basados en residuos de cosecha de trigo obtenidos en la zona sur de Chile. Para esto se utilizaron aislados de cuatro especies de hongos: *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Pleurotus ostreatus* y *Corioloopsis rígida*, los que fueron adicionados con estabilizantes químicos (óxidos de hierro o aluminio y arcillas alofánicas), los cuales se incorporaron al cabo de 14, 70 y 112 días iniciado el proceso de compostaje. Se evaluaron los índices de humificación (IH), evolución temporal de IH y grupos funcionales de nueve tratamientos seleccionados a través de un análisis de ordenamiento jerárquico. Los resultados mostraron altos índices de humificación en el hongo *Corioloopsis rígida* lo que indica un mayor contenido de cadenas alifáticas y un menor peso molecular. En contraparte el hongo *Trametes versicolor* junto a *Pleurotus ostreatus* presentaron índices menores lo que demuestra un aumento en el peso molecular y una menor proporción de ácidos carboxílicos, esto conlleva a una mayor eficiencia en el proceso de humificación de la materia orgánica. Cabe destacar que cuando se añaden óxidos metálicos como  $Al_2O_3$  y  $Fe_2O_3$  al proceso de compostaje, se observa un cierto efecto catalítico del proceso de humificación, así como una capacidad de agente complejante que determina la producción de moléculas con un mayor tamaño y peso molecular. Esto sugiere que la adición de algunos compuestos químicos incrementa la acción de hongos degradadores de residuos lignocelulótico, lo que puede representar una alternativa técnicamente viable en procesos de manejo de residuos o tratamiento de suelos degradados.

## 8. SUMMARY

The incorporation of lignin-and-cellulose-rich materials degraders, together to the use of abiotic stabilizers is a possible alternative to manage the waste materials produced after wheat crop, in order to obtain a composted material to be used as amendment on agricultural soils or as a restoring agent of degraded soils. For this reason, the objective of this study was to analyze the temporal evolution of the humification of lignocellulosic waste materials, as an indicator of the effectiveness of certain isolates of saprobic fungi and chemical additives as compost stabilizers based on wheat crop waste obtained in the South of Chile. For this, four fungi species isolates were used: *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Pleurotus ostreatus* and *Coriolopsis rigida*, which were added with chemical stabilizers (iron or aluminum oxide and allophanic clays) at 14, 70 on 112 days once the composting process started. The humification indexes (HI), temporal evolution of HI and the functional groups of nine treatments selected through a hierarchical organization analysis were evaluated. The results showed high humification indexes on the fungus *Coriolopsis rigida* which indicates a greater content of aliphatic chains and a lower molecular weight. On the contrary, the fungus *Trametes versicolor* and the *Pleurotus ostreatus* showed lower indexes, which demonstrates an increase on the molecular weight and a smaller proportion of carboxylic acids. This takes to a greater efficiency in the humification process of the organic matter. It is important to mention that when metal oxides are added to the composting process, such as  $\text{Al}_2\text{O}_3$  y  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , a catalytic effect of the humification process is observed, as well as a capacity of complexing agent that determines the production of molecules with a greater size and molecular weight. Moreover, this suggests that the addition of some chemical compounds increases the action of degrading fungi that can be a technically feasible alternative in the process of waste management or degraded soils treatment.

## 9. LITERATURA CITADA

- Aranda, E.**, 2006. Fraccionamiento físico del alpeorujo como base para desarrollar una estrategia biológica con hongos saprobios y arbusculares para la eliminación de su fitotoxicidad. Tesis doctoral. Universidad de Granada. España. 30-32p.
- Alexander, M.**, 1967. Introduction of soil microbiology, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Bellapart, C.** 1996. Nueva Agricultura Biologica en Equilibrio con la Agricultura Quimica. Ediciones Mundi, Barcelona, España 298p.
- Botella, C., De Ory, I., Webb, C., Cantero, D., Blandino, A.** 2004. Produccion de enzimas hidroliticas por *Aspergillus awamori* sobre orujo de uva. Congreso Nacional de Biotecnología, Biotec 2004, Oviedo, España, pp.158.
- Bollo, E.** 1999. Lombricultura, una alternativa de reciclaje. Ediciones Mundi-Prensa, Barcelona, España 150 p
- Buffle, J., Greter, F., Haerdi, W.** 1977. Measurement of complexation properties of humic and fulvic acids in natural waters with lead and copper ion-selective electrodes. *Anal. Chem.* (49) 2:216-222.
- Buswell, J.A., Odier, E.**, 1987. Lignin Biodegradation. *Critical Reviews in Biotechnology* 6:1-60.
- Coello, J.**, 2011. Aplicación del hongo *Pleurotus ostreatus* como alternativa para la biorremediación de los suelos contaminados con metales pesados. Tesis pregrado. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil. Ecuador.
- Cornejo, P.**, 2006. Influencia de la cobertura vegetal sobre la diversidad y estructura de las comunidades de hongos micorrícicos y sus efectos en la estabilización de suelo degradados. Tesis doctoral. Universidad de Granada. España.
- Chen, Y., Senesi, N., Schnitzer, M.**, (1977). Information provided on humic substances by E4/E6 ratios. *Soil. Sci. Soc. Am.*41: 352-358.
- Davila, G., R. Vazquez-Duhalt, R.**, 2006. Enzimas ligninolíticas fungicas para fines ambientales. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México, p. 37.
- Delgado, M.**, 2005. Los microorganismos del suelo en la nutrición vegetal. orius biotecnología.
- Evans, L.T.** 1993. Crop evolution, adaptation and yield. Cambridge University Press, Gran Bretaña. 500 p.

- Eggert, C., Temp, U., Dean, J. F. D., y Eriksson, K.-E. L.** 1996. A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Lett.* 391:144-148
- Eriksson, K.E., Blanchette, R.A., Ander, P.** 1990. Microbial degradation of wood and wood components. Springer-Verlag, Berlin. Pp.3-35.
- Frazar, C.** 2000. Bioremediation and phytoremediation of pesticides contaminated sites. Prepair for US Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste and emergency Response, Technology Innovation Office. Washington, DC.
- Fengel, M., Wegener, G.,** 1984. Wood Chemistry, Ultrastructure and reactions. Ed: Walter de Gruyter. Berlin-New York.
- Florenza, P., Martinez, J.,** 1991. Horticultura y Materia Orgánica. Horticultura 66:42-45.
- Garcia, R., Salas, J., Riera, R., Zambrano, C., Maggiorani, A., Garcia, A.** 2005. Uso del antagonista *Trichoderma Harzianum* para controlar tres enfermedades fungosas del suelo. Centro de Investigaciones Agrícolas del Estado de Merida.
- Gajdosova, D., Pokorma, L., Laska S., Prosek P., Havel.,** 2001. Are there humic acids in Antarctica? Humic Substances. Structures, Model and Functions. RSC. Cambridge, United Kingdom.
- Geng, X., Li, K.** 2002. Degradation of non-phenolic lignin by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. Applied Microbiology and Biotechnology 60: 342-346.
- Glenn, J. K., Morgan, M. A., Mayfield, M. B., Kuwahara, M., y Gold, M. H.,** 1983 An extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring enzyme preparation involved in lignin biodegradation by the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114:1077-1083
- Ghosh, N., Ganguly, S. and Banik, A.K.** 2011. Comparison of microbial humic acid produced by *Aspergillus niger* X<sub>1</sub> and soil humic acid. International Journal of Pharma and Bio Sciences.2(2): B-478-B-483.
- Grinhut, T., Hadar, Y. and Chen, Y.** 2007. Degradation and transformation of humic substances by saprotrophic fungi: processes and mechanisms. Fungal biology reviews, 21:179 – 189.
- Guerrero, A.** 1996. El suelo, los abonos y la fertilización de los cultivos. Ediciones Mundi, Bilbao, España. 206 p.
- Hatakka, A.** 1994. Lignin-modifying enzymes from select white-rot fungi production and role in lignin degradation. FEMS Microbiology Review 13: 125-135.
- Honorato, R.,** 1993. Manua de Edafologia. Editorial Universitaria S.A. Ediciones Universidad Catolica de Chile. 193 p.

- Kirk, T.K., Farrell, R.L.** 1987. Enzymatic combustion: The microbial degradation of lignin. *Annual Review of Microbiology* 41: 465-505.
- Kononova, M.** 1966. *Soil Organic Matter*. Pergamon, Elmsford, Nueva York.
- Lahdesmaki, P., Piispanen, R.** 1988. Degradation products and the hydrolytic enzymeactivities in the soil humification processes. *Soil Biology and Biochemistry* 20: 287-292.
- Landeros, F.** 1993. Monografía de los ácidos húmicos y fulvicos. Tesis. Facultad de Agronomía. Universidad Católica de Valparaíso. Chile. 145 p.
- Llado, S.,** 2012. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos pesados y caracterización de comunidades microbianas implicadas. Tesis doctoral. Universitat de Barcelona
- Medina, J.,** 2013. Application of chemically stabilized compost in order to improve the remediation effect in copper-arsenic polluted soils, Departamento de Ciencias Químicas y Recursos Naturales. Universidad de La Frontera. Chile.
- Melo, L.,** 2006. Análisis y caracterización de Ácidos Fulvicos y su interacción con algunos metales pesados. Tesis doctoral. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería. Pachuca de Soto, España.
- ODEPA,** 2011. (Oficinas de Estudios y Políticas Agrarias, Ministerios de Agricultura). Boletín del trigo. 2 Producción y consumo mundial de trigo.
- Orellana, L.,** 2012. Evolución de actividades enzimáticas en el compostaje de residuos lignocelulosicos por hongos aislados del sur de Chile junto con distintos aditivos químicos. Tesis de pregrado. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales. Universidad de La Frontera.
- Oliva, J.,** 2003. “Efecto de los productos de degradación Originados en la explosión a vapor de Biomasa de Chopo sobre *Kluyveromyces marxianus*”. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas, p.166.
- Pointing, S.B.** 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology* 57: 20-33.
- Saparrat, M. C. N., Guillén, F., Arambarri, A. M., Martínez, A. T., y Martínez, M. J.,** 2002. Induction, isolation, and characterization of two laccases from the whiterotbasidiomycete *Corilopsis rigida*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1534-1540
- Sariaslani, F.S.** 1989. Microbial enzymes for oxidation of organic molecules. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 171-257.

- Senesi, N., Miano, T., Provenzano, M., Brunetti, G.** 1991. Characterization, differentiation and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. *Soil Sci.* 152: 259-271.
- Steinberg, C.** 2003. *Ecology of humic Substances in Freshwaters.* Springer.
- Stevenson, F.J.** 1982. *Humus Chemistry genesis,* Wiley, New York, Estados Unidos.
- Schnitzer, M., Khan, S.** 1972. *Humic Substances in the Environment.* Marce Dekker. New York.
- Tisdale, S., Nelson, W.** 1966. *Soil fertility and fertilizers.* Segunda edición. Macmillan company. New York, Estados Unidos. 694 p.
- Tuor, U., Winterhalter, K., Fiechter, A.** 1995. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. *Journal of Biotechnology* 41: 1-17.
- Trade Corp,** 2001. Informe técnico Humistar. España.
- UNFPA,** 2011. Estado de la población mundial, 7 mil millones de personas, su mundo sus posibilidades. p. 2-3
- Von Lütow, M., Kögel-Knabner, I., Ekschmitt, K., Matzner, E., Guggenberger, G., Marschner, B., Flessa, H.,** 2006. Stabilization of organic matter in temperate soils: Mechanisms and their relevance under different soil conditions - a review. *European Journal of Soil Science* 57, 426-445.
- Wright, J.R. and Schnitzer, M.** 1959. Oxygen-Containing Functional Groups in the Organic Matter of a Podzol Soil. *Nature* 184: 1462-1463.

