

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



**EVOLUCION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN EL COMPOSTAJE
DE RESIDUOS LIGNOCELULOSICOS POR HONGOS AISLADOS
DEL SUR DE CHILE JUNTO CON DISTINTOS ADITIVOS
QUIMICOS**

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.

LUIS EDUARDO ORELLANA RIQUELME

TEMUCO – CHILE
2012

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



**EVOLUCION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN EL COMPOSTAJE
DE RESIDUOS LIGNOCELULOSICOS POR HONGOS AISLADOS
DEL SUR DE CHILE JUNTO CON DISTINTOS ADITIVOS
QUIMICOS**

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.

LUIS EDUARDO ORELLANA RIQUELME

PROFESOR GUÍA: PABLO ENRIQUE CORNEJO RIVAS

TEMUCO – CHILE
2012

**EVOLUCION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN EL COMPOSTAJE
DE RESIDUOS LIGNOCELULOSICOS POR HONGOS AISLADOS
DEL SUR DE CHILE JUNTO CON DISTINTOS ADITIVOS
QUIMICOS**

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

Primero agradecer la confianza y el tiempo al Dr. Pablo Cornejo Rivas, profesor guía de esta tesis de grado.

Agradezco igualmente 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.

Agradezco también al Programa de Apoyo a Profesores Patrocinantes de Pre y Postgrado de la Dirección de Investigación de la Universidad de La Frontera, proyecto DI12-2004, por la ayuda brindada.

Quisiera igualmente agradecer por la ayuda y paciencia en el trabajo de laboratorio a Susana García.

Por último, agradecer al Dr. Marcelo Panichini por el tiempo y la confianza dentro del proceso formativo dentro de la Universidad.

INDICE

Capítulo		Página
1.	INTRODUCCION	1
2.	REVISION BIBLIOGRAFICA	3
2.1.	Descripción de los componentes de la biomasa lignocelulósica	4
2.1.1	La celulosa	4
2.1.2	La hemicelulosa	5
2.1.3	La lignina	5
2.2	Enzimas degradadoras de componentes de lignocelulosa y actividad microbiana	7
2.2.1	Lacasa	7
2.2.2	Manganeso peroxidasa	7
2.2.3	β -Glucosidasa	8
2.3	Hongos degradadores de celulosa	8
2.3.1	Hongos de podredumbre blanca	9
2.3.2	Hongos de podredumbre parda	9
2.3.3	Hongos de podredumbre blanda	10
2.3.4	Hongos que tiñen la madera	10
2.4	Estabilización de la materia orgánica	11
2.5	Perspectivas de desarrollo de la temática	11
3.	MATERIALES Y METODOS	12
3.1	Cultivo de los aislados en placa	12
3.2	Unidades experimentales y diseño experimental	13
3.3	Muestreo	14

3.4	Procedimiento para la obtención del extracto enzimático	14
3.5	Reacciones enzimática	15
3.5.1	Actividad Lacasa	15
3.5.2	Actividad manganeso peroxidasa (MnP)	15
3.5.3	Actividad de β -glucosidasa	15
3.6	Análisis estadístico	16
3.6.1	Análisis de la varianza unifactorial	16
3.6.2	Análisis multivariante	16
3.6.3	Análisis factorial	16
3.6.4	Análisis de correlaciones	17
3.6.5	Análisis de conglomerados	17
4.	PRESENTACION DE RESULTADOS Y DISCUSION	18
4.1	pH	18
4.2	Actividad lacasa	20
4.3	Enzima manganeso peroxidasa (MnP)	23
4.4	Enzima beta-glucosidasa	26
4.5	Análisis conglomerados y correlaciones	29
5.	CONCLUSIONES	32
6.	RESUMEN	33
7.	SUMMARY	34
8.	LITERATURA CITADA	35

1. INTRODUCCION

El crecimiento actual de la población ha traído consigo un aumento de la superficie de los cultivos para alimentación primaria, como son el maíz, arroz y trigo, los que se han convertido en los productos con mayor demanda en el mundo. Por lo anterior, estos cultivos producen volúmenes de desechos considerables. Según un estudio de Hetz et al. (2006) la cantidad total de paja existente en los rastrojos de trigo alcanzó un promedio de 6.434 kg ha^{-1} .

Debido a esto la población ha tenido que hacer uso y disminución de los rastrojos de cosecha, usando algunas alternativas de manejo de residuos como la quema de los rastrojos, que produce una carga de residuos de $4,75 \text{ t ha}^{-1}$ (Ruiz, 2011). Otra alternativa es mantener los rastrojos en el suelo, o sembrar con rastrojos. También se incluye en la industria de los hongos, fábrica de compost, cama para animales entre otros (Ruiz, 2011).

Es importante considerar que cuando se incorporan los desechos al suelo estos permanecen un tiempo considerable antes de que se oxiden, ya que grandes cargas de materia orgánica no estabilizada podría provocar algún grado de toxicidad en los suelos. Esta situación genera una oportunidad, ya que se crea un mercado en el manejo de desechos agrícolas, lo que trae consigo inversiones para la investigación de manejo de residuos con las distintas alternativas, y también empresas que prestan asesoría para su manejo.

Entre esto, considerando la alta presencia de materiales lignocelulósicos presentes en estos residuos, y su dificultad para ser transformados y estabilizados, una parte importante de la investigación requerida se debe centrar en la búsqueda de alternativas para promover su degradación y estabilización. En el segundo aspecto, resulta destacable que una alta estabilidad de estos materiales permitirá una presencia prolongada en el suelo, evitando aumentar los contenidos de gases atmosféricos con efecto invernadero.

Es por todo lo antes descrito que la hipótesis que se planteó para este estudio fue:

“La actividad de enzimas lignocelulósicas de diversos hongos degradadores aislados de ambientes templados del sur de Chile, servirán como un índice adecuado de la eficiencia de la

transformación de restos de cosecha de trigo, adicionados o no con estabilizantes químicos (óxidos de hierro, aluminio, arcillas alofánicas), permitiendo determinar las combinaciones de hongos y estabilizantes más adecuados para la generación de compost”.

Los objetivos que se propusieron para el presente estudio fueron:

- Objetivo General:

“Analizar la variación temporal de las actividades enzimáticas lignocelulósicas y de actividad microbiana, y determinar su utilidad como indicador de la efectividad de aislados autóctonos de hongos saprobios en procesos de compostaje de residuos de cosecha de cereales producidos en el sur de Chile”.

- Objetivos Específicos

- Analizar las variaciones temporales de las actividades de las enzimas Manganese peroxidasa, Lacasa y Beta-glucosidasa a lo largo de un proceso de compostaje de paja de trigo.
- Analizar el efecto catalítico o estabilizante de óxidos de hierro, aluminio o arcillas alofánicas sobre las actividades enzimáticas de los hongos utilizados.
- Establecer índices de estabilización de los residuos transformados a partir de las actividades enzimáticas determinadas.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA

Hace aproximadamente un año se cumplió un hito en el Planeta; la población a nivel mundial alcanzó los 7.000 millones de personas (UNFPA, 2011). Cada una de ellas requiere satisfacer sus necesidades básicas, tales como alimento, vestimenta, hogar, entre otros. Por ello se necesita producir mayores volúmenes de productos que alimenten a la creciente masa de población. Según la CEPAL (2012), América Latina y el Caribe son “la regiones en que más ha crecido la producción agrícola, ganadera, forestal y pesquera en los últimos 15 años”.

Dentro de los alimentos, el maíz, arroz y trigo son los productos más demandados en la dieta del ser humano. Por lo mismo, su producción genera volúmenes considerables de desechos que varían dependiendo de las condiciones climáticas y edáficas (Solé y Flotats, 2004). Por ejemplo, el trigo posee una superficie de 225,65 millones de hectáreas (ODEPA, 2011) y es uno de los alimentos más consumidos, alcanzando una producción mundial sobre los 683 millones de toneladas cada año.

Según Solé y Flotats (2004), la producción de paja en los cultivos de cereales de regadío es considerable. En el caso del cultivo de maíz en el Valle del Ebro (España) oscila entre 10 y 14 Mgha^{-1} y de trigo entre 4 y 6 Mgha^{-1} . En Chile según un estudio de Hetz et al., (2006) la cantidad total de paja existente en los rastrojos alcanza un promedio de 6.434 kg ha^{-1} . La cantidad de paja posible de recolectar con enfardadora desde un cordón fluctúa entre 1,47 y 4,48 t ha^{-1} , con un promedio de 2,44 t ha^{-1} , por lo que queda todavía un volumen considerable de paja que no se utiliza para almacenaje, y que normalmente es quemada, generando problemas ambientales que cada vez son más considerables. Estos rastrojos son ricos en componentes del tipo lignocelulósico. Esta biomasa lignocelulósica está formada básicamente por tres componentes principales: celulosa, hemicelulosa y lignina, junto con otros componentes minoritarios que no forman parte de la pared celular como, son los extractivos y las cenizas. La celulosa y hemicelulosa son polisacáridos de alto peso molecular que representan entre el 60-80% del total del peso de los materiales lignocelulósicos (Tomás, 2010); La lignocelulosa es el principal y más

abundante componente de la biomasa producida por la fotosíntesis vegetal, produciendo anualmente 200.000 millones de toneladas en el mundo (Ragauskas et al., 2006).

2.1 Descripción de los componentes de la biomasa lignocelulósica

2.1.1 La celulosa

La celulosa es un polímero formado por monómeros de D-glucosa, unidades que van unidas por enlaces glucosídicos β -1,4 que se estructuran en largas cadenas lineales (microfibrillas) unidas por puentes de hidrógeno y fuerzas intramoleculares de van der Waals, formando una estructura cristalina resistente a la hidrólisis, así como también regiones amorfas susceptibles a la degradación enzimática (Ovando y Waliszewski, 2005).

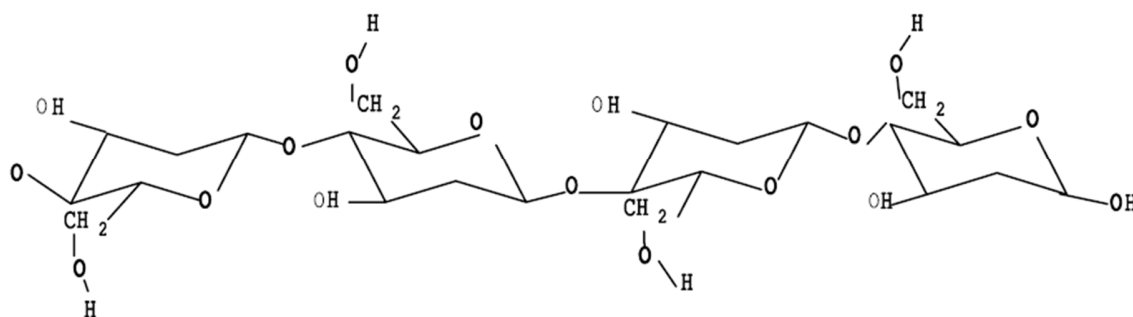


Figura 1. Estructura en cadena de la celulosa (Tomás, 2010).

2.1.2 La hemicelulosa

La hemicelulosa es un polímero complejo de heteropolisacáridos formado por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa) y hexosas (D-glucosa, D-manosa y D-galactosa) que forman cadenas ramificadas y los ácidos 4-O-metilglucurónico, D-galacturónico y D-glucurónico. Los azúcares están unidos por enlaces β -1,4 y ocasionalmente por enlaces β -1,3 (Pérez et al., 2002).

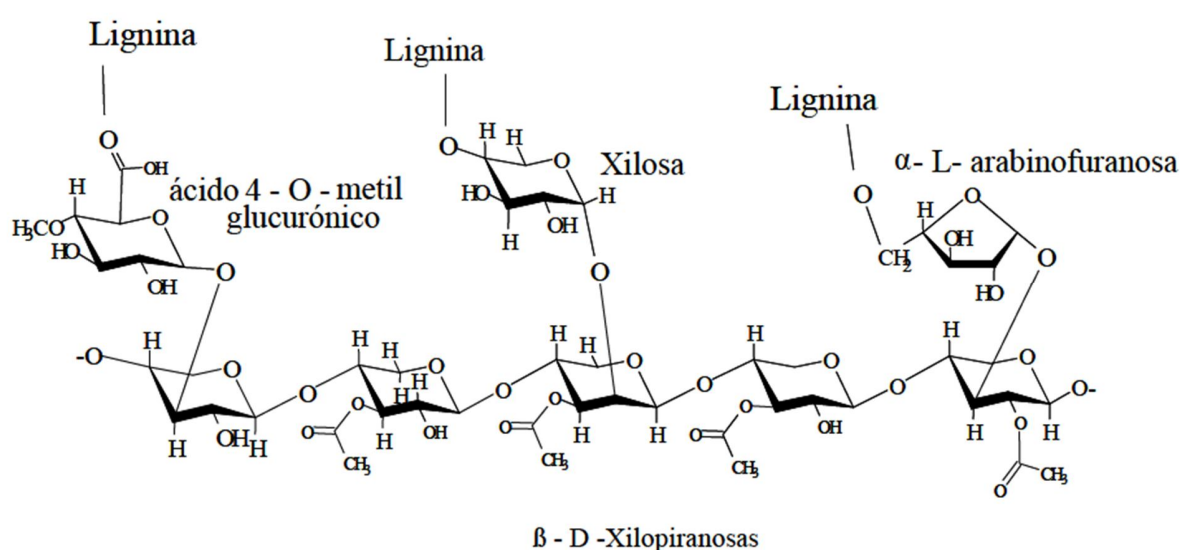


Figura 2. Arabinoxilano característico de la hemicelulosa de la paja de trigo (Tomás, 2010).

2.1.3 La lignina

La lignina es un heteropolímero amorfo, tridimensional y ramificado formado por alcoholes aromáticos que da soporte estructural, rigidez, impermeabilidad y protección a los polisacáridos estructurales (celulosa y hemicelulosa) y es altamente resistente a la degradación química y biológica (Aro et al., 2005). Existen dos tipos de sistemas enzimáticos extracelulares que pueden atacar estos componentes: por una parte, los que producen hidrolasas que degradan la celulosa (celulasas) y la hemicelulosa (hemicelulasas), y por otra parte, los que despolimerizan la lignina por reacciones de oxidación (peroxidasas y lacasas) (Pérez et al., 2002).

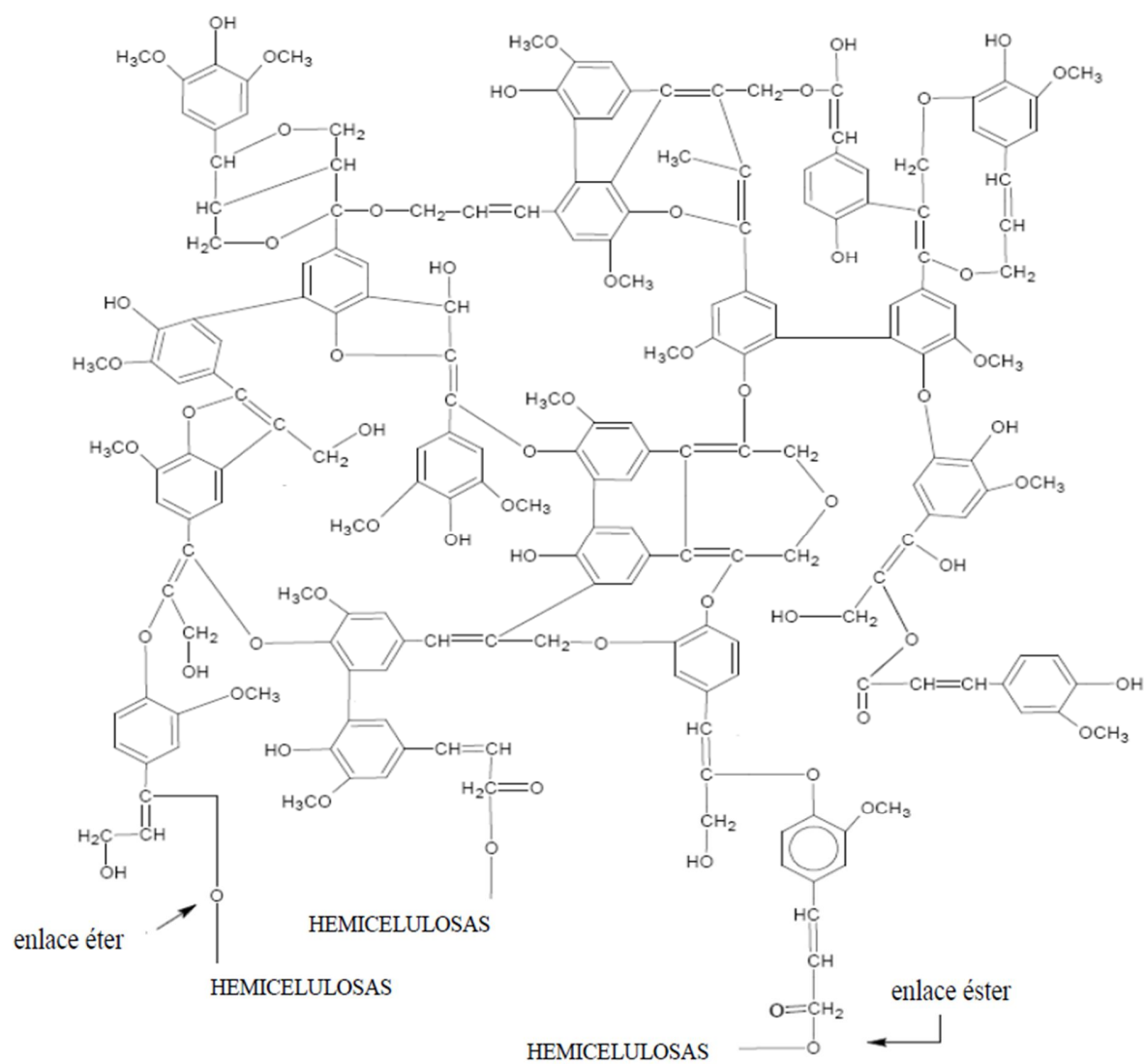


Figura 3. Estructura aproximada de la lignina en la paja de trigo (Tomás, 2010).

2.2 Enzimas degradadoras de componentes de lignocelulosa y actividad microbiana

2.2.1 Lacasa

Las lacasas son metaloenzimas de tipo fenoloxidasa, que contienen cobre en su centro activo y utilizan el oxígeno como aceptor final de electrones, reduciéndolo a agua. Presentan especificidad de sustrato sobre fenoles y aminas aromáticas sustituidas (Valles, 2006). Según Selvam et al., (2003) las lacasas son glicoproteínas que requieren oxígeno (O_2) para oxidar fenoles, polifenoles, aminas aromáticas, sustratos orgánicos por medio de la substracción de un electrón transformándolo en H_2O_2 y radicales activos.

Son enzimas capaces de oxidar principalmente sustancias recalcitrantes, como clorofenoles, hidrocarburos aromáticos policíclicos, compuestos organofosforados, fenoles y colorantes aromáticos (Moreno y Ospina, 2008).

2.2.2 Manganese peroxidasa

La manganese peroxidasa (MnP_x) es una glicoproteína con un grupo hemo (Consta de una parte orgánica y un átomo de hierro) como grupo prostético. Cataliza la oxidación de Mn^{2+} a Mn^{3+} , el cual es responsable de la oxidación de lignina y de varios compuestos modelo de lignina, fenólicos y no fenólicos. En ausencia de H_2O_2 puede funcionar como oxidasa, usando como sustrato NAD(P)H y produciendo H_2O_2 (Díaz, 2010).

Según Dávila y Vázquez (2006) El MnP^{3+} generado por la MnP es una especie altamente oxidante con el inconveniente de ser altamente inestable en medio acuoso. Para superar este inconveniente, los hongos ligninolíticos secretan ácido oxálico (y otros ácidos como el malónico) que acomplejan el MnP^{3+} . Estos ácidos dicarboxílicos forman complejos estables con el Mn^{3+} capaces de difundir a través de la estructura de la pared celular vegetal y que actúan como oxidantes de compuestos fenólicos

2.2.3 β -Glucosidasa

Las β -glucosidasas, en un primer paso, se producen por la liberación del monoterpenil β -D-glucósido más el correspondiente azúcar residual. Esta reacción es llevada a cabo por una α -L-arabinosidasa, una α -L-ramnosidasa, o una β -apiosidasa con la liberación de una arabinosa, una ramnosa o una apiosa respectivamente, más el correspondiente glucósido unido a la glicona por un enlace β -D-glucosídico cuyo enzima específico de hidrólisis es la β -glucosidasa (Arévalo, 2006). Según Arévalo (2006), actualmente en la elaboración del vino, para incrementar la liberación de aromas se usan preparados enzimáticos comerciales de origen fúngico, principalmente procedentes de *Aspergillus* spp.

2.3 Hongos degradadores de celulosa

Los hongos son organismos heterótrofos que se alimentan por absorción. Para la obtención de nutrientes, la gran mayoría de ellos liberan al medio enzimas extracelulares hidrolíticas y oxidativas que degradan parcialmente los diferentes constituyentes de la lignocelulosa para ser incorporados al interior de las células y metabolizados. La gran excepción a esto son los hongos simbioses obligados, en particular los hongos formadores de micorrizas arbusculares del Phylum Glomeromycota (Cornejo, 2006).

Los hongos no simbioses de vida libre poseen una organización hifal, y un sistema de translocación intrahifal que les permite explorar una gran área en busca de nutrientes (Valles, 2006). Además, poseen una capacidad para adaptarse a medios ambientes severos, sin restricciones (Preussler et al., 2010). Los hongos ligninolíticos son los únicos organismos capaces de despolimerizar y mineralizar el polímero de lignina (Hammel, 1997). Entre éstos, se encuentran hongos de podredumbre blanca, parda y blanda según los materiales lignocelulósicos a los que atacan (Díaz, 2010). También se considera dentro de estos organismos un cuarto grupo, denominado hongos que tiñen la madera. Algunas características de cada uno de estos grupos se presentan a continuación.

2.3.1 Hongos de podredumbre blanca

Este tipo de podredumbre es la más frecuente en la degradación de la madera y es llevada a cabo por hongos basidiomicetos y algunos ascomicetos. Estos hongos se caracterizan por su habilidad para degradar lignina, celulosa y hemicelulosa y son los únicos organismos capaces de degradar la lignina hasta mineralizarla, adquiriendo la madera una coloración blanquecina y aspecto fibroso (Valles, 2006). Entre los hongos se destacan *Pleurotus ostreatus*, *Lentinus hirtus*, *Bjerkandera adusta*, *Irpex lacteus*, *Dichomituss qualens*, *Phanaerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor* (Pointing, 2001).

Según Morales y Ruiz (2008) los hongos, incluyendo las levaduras, han recibido especial atención con relación a la biosorción de metales, particularmente porque la biomasa fúngica se origina como un subproducto de diferentes fermentaciones industriales. La acumulación de iones por biomasa íntegra parece que se lleva a cabo principalmente por biosorción independiente del metabolismo, siendo la pared celular el principal sitio de acumulación.

2.3.2 Hongos de podredumbre parda

Este grupo representa alrededor de un 7 % del total de hongos descomponedores de la madera, y está integrado exclusivamente por basidiomicetos. Degradan principalmente madera de coníferas, las que adquieren un aspecto cuarteado (cúbico) desde los primeros estadios de degradación. Estos hongos atacan principalmente los polisacáridos de la madera con una mínima degradación de la lignina. La madera adquiere un color marrón debido a la presencia de lignina oxidada (Valles, 2006). Este grupo de hongos es el menos numeroso de los hongos de la podredumbre de la madera (7%), pertenecen todos ellos al grupo de los Basidiomicetes y destacan géneros como *Fomes* o *Poria* (Eriksson et al., 1990).

2.3.3 Hongos de podredumbre blanda

Este grupo está formado principalmente por ascomicetos y deuteromicetos. Generalmente colonizan y degradan la madera en contacto con el suelo, en procesos que a menudo están asociados a las bacterias. Colonizan la madera en condiciones extremas de alto o bajo potencial hídrico, en las que otros hongos no pueden desarrollarse. Degradan principalmente los polisacáridos con una alteración mínima de la lignina. Aunque tradicionalmente este grupo se asociaba a ascomicetos, recientemente se ha comprobado que ciertos basidiomicetos son capaces de degradar la madera con este tipo de podredumbre (Valles, 2006). Se conocen unos 300 géneros de hongos de esta podredumbre, entre los que destacan *Ceplalosporium*, *Acremonium* y *Paecilomyces* (Aranda, 2006)

2.3.4 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).

Si bien los sustratos principales de crecimiento de los cuatro grupos de hongos mencionados arriba son las maderas de distintas especies arbóreas, durante los últimos años se ha visto un incrementado interés por su utilización en otros tipos de sustratos ricos en materiales lignocelulósicos, como es el caso de las pajas de cereales. Por esto, su utilización biotecnológica reviste una gran importancia en un futuro cercano, favoreciendo la transformación y estabilización de estos compuestos para ser utilizados como abonos o enmiendas orgánicas.

2.4 Estabilización de la materia orgánica

Conviene distinguir el proceso de estabilización de la MO del proceso de acumulación de la MO. La MO 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. 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 (ejemplo: oxi-hidróxidos de Fe y Al, aluminosilicatos) o simplemente por la inaccesibilidad de la MO para los microorganismos (Von Lützow et al., 2006). Aquí se destacan las interacciones con compuestos orgánicos, según Gartzia (2009) adsorción de la MO por las superficies reactivas de los aluminosilicatos y los oxihidróxidos de Fe y Al y la complejación de la MO con iones metálicos forma complejos organominerales; con una tasa de retorno lenta. Los oxi-hidróxidos de Fe- y Al- pueden formar ligandos con grupos funcionales de la MO, principalmente con grupos carboxílicos y fenólicos, y la formación de complejos organo-alumínicos tiene lugar principalmente en un rango de pH entre 4.3-4.7.

2.5 Perspectivas de desarrollo de la temática

Como aporte de este tipo de estudios, se observa una contribución en la búsqueda de herramientas biotecnológicas que pueden significar el adoptar medidas eficaces y efectivas para hacer un uso final de grandes volúmenes de residuos de cereales que se producen a futuro, y que en la actualidad simplemente se están desaprovechando. En este contexto, los hongos ligninolíticos podrían ser una alternativa eficiente en el manejo de los residuos agrícolas, junto con algunos aditivos, como el Fe_2O_3 y el propio suelo que pudiese contener cantidades importantes de alofán, que es conocido por estabilizar fuertemente la materia orgánica (Calabi-Floody et al., 2011). Esto puede significar el obtener materiales transformados con importantes aplicaciones en la estabilización de carbono en suelo, tanto agrícolas como naturales, mejorando las condiciones del mismo y el crecimiento de las plantas.

3. MATERIALES Y METODOS

En una primera etapa, previa al establecimiento de las unidades experimentales para compostaje, se realizó la multiplicación de los aislados de los hongos autóctonos utilizados: *Trametes versicolor* (L.) Lloyd, *Trichoderma harzianum* (Rifai), *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. y *Corioloropsis rigida* (Berk&Mont.) Murrill. Esto se realizó en cultivo en placas con medio de crecimiento axénico, de forma de obtener material biológico suficiente para ser incorporado a las distintas unidades experimentales.

3.1 Cultivo de los aislados en placa

El medio de cultivo sólido utilizado fue un medio Saboureaud ajustado a pH 5,6. Este medio fue inoculado con trozos de placas previamente cultivadas con los hongos. Los aislados provenían del Laboratorio de Micorrizas (*P. ostreatus*) y del Laboratorio de Biorremediación (*C. rigida*, *T. versicolor* y *T. harzianum*) de La Universidad de La Frontera de Temuco. El aislado de *P. ostreatus* corresponde a un aislado del hongo para producción comercial, mientras que las otras tres cepas fueron aisladas desde material obtenido del predio Rucamanque, administrado por La Universidad de La Frontera.

Procedimiento

1. Para preparar 1000 mL del medio se agregaron: medio Saboureaud en polvo 65 g; sulfato de magnesio 0,5 g; fosfato dihidrógeno de potasio 0,5 g; sulfato de hierro 0,16 g; Tiamina 0.2 µg.
2. Luego, se ajustó el pH a 5,6.
3. Se autoclavó por 20 minutos a 121°C.

4. Posteriormente, en cámara de flujo laminar, el medio se distribuyó en una proporción de 2/5 de cada placa Petri, se dejó solidificar y se agregó el trozo de gel de crecimiento de cada aislado en las distintas placas, usando bisturís y pinzas estériles.
5. Luego de esto, las placas se incubaron a 28°C por 1-2 semanas, luego de lo cual fueron refrigeradas hasta su incorporación a las unidades experimentales.

3.2 Unidades experimentales y diseño experimental

Cada unidad experimental estuvo compuestas por cañas de postcosecha de trigo, trituradas entre 1–2 cm de longitud en molino, desinfectadas con vapor por 30 minutos, colocadas en bolsas de plástico resistentes al calor e inoculadas con distintos tipos de hongos. Cada unidad experimental contó con una masa de 1.4 kg del material antes descrito. Cada unidad experimental se cerró y se dejó en condiciones aeróbicas mediante un sistema respiradero compuesto por tubos de 30 centímetros de PVC de 50mm de diámetro, donde uno de sus extremos fue taponado con algodón y cubierto con un trozo de gasa, para mantener las condiciones aeróbicas y reducir las contaminaciones. Las placas de crecimiento de cada hongo fueron disgregadas finamente en sistema de licuación, en 400 mL de agua estéril, y en cada unidad experimental se utilizaron 200 mL de la suspensión homogenizada. Se dejaron crecer en esas condiciones, en invernadero sin acceso de luz durante 2 semanas y fueron aplicados los distintos tratamientos.

Cada hongo fue sometido a 12 tratamientos distintos, consistentes en todas las combinaciones posibles de aditivos químicos (4 aditivos) y tiempos de aplicación en que fueron incorporados a lo largo del proceso de degradación (3 tiempos). Los tiempos de aplicación fueron a las 2, 10 y 16 semanas de compostaje, en una dosis correspondiente al 2% en peso de óxido de hierro (Fe_2O_3), óxido de aluminio (Al_2O_3) o materiales alofánicos provenientes del horizonte de transición B/C de un suelo de la serie Pemehue. Este horizonte del suelo posee un porcentaje cercano al 50 % de alofanos en la fracción arcilla (aprox. un 50% de arcillas totales). En el siguiente cuadro se menciona la cantidad de gramos utilizados en cada caso.

Cuadro 1. Distintos aditivos y masa utilizada para cada uno de los hongos utilizados en el experimento.

Estabilizante químico	Masa en gramos
Suelo	146
Óxido de hierro	20,6
Óxido de aluminio	20,8

3.3 Muestreo

Cada dos semanas se tomaron muestras de cada unidad experimental (aproximadamente 40 g), y se les determinó las distintas actividades enzimáticas que se describirán más adelante. Al cabo de dos semanas del momento de la inoculación se tomó la primera muestra (tiempo 0), en coincidencia con la primera aplicación de aditivos en los tratamientos que fueron adicionados. Antes de cada muestreo se realizó una homogeneización de la unidad experimental. Se totalizó un total de 10 muestreos a lo largo del proceso.

3.4 Procedimiento para la obtención del extracto enzimático

1. De cada unidad experimental se obtuvo 1 gramo de muestra y se depositó en un tubo cónico de 15 mL.
2. Luego se le adicionó 13 mL de buffer acetato de sodio 50 mM a pH 5.
3. Se refrigeró al menos dos horas, luego de cumplido el tiempo se centrifugó a 2500 RPM por cinco minutos.
4. Inmediato al centrifugado, se filtraron las muestras por siete minutos aproximados, quedando el extracto listo para las determinaciones de las actividades enzimáticas. Dado el gran volumen de muestras, los extractos fueron ultra congelados a -80°C hasta su procesamiento.

3.5 Reacciones enzimática

3.5.1 Actividad Lacasa

Se valoró utilizando como sustrato 2,2 azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato) (ABTS) 2mM, utilizando también el buffer acetato de sodio 50mM a pH 5,0 (Gonzales et al., 2003). Se determinó a una absorbancia de 420nm. El volumen por cubeta de cada componente fue: 180 μ L de Buffer acetato de sodio, 60 μ L de ABTS, 600 μ L de extracto de muestra y 60 μ L de agua desionizada. Por cada tratamiento se realizó un triplicado. Además, esta enzima se determinó a 0, 3 y 5 minutos de formada la reacción. Esto se realizó para observar si variaba la expresión de la enzima al cabo de los distintos tiempos.

3.5.2 Actividad manganeso peroxidasa (MnP)

La valoración de esta actividad se llevó a cabo utilizando como sustrato 2,6 dimetoxifenol (DMP), MnSO_4 y H_2O_2 . El DMP 4mM, es oxidado por el Mn^{3+} (producto de la oxidación del MnSO_4 0,1 mM, por la MnP) en presencia del tampón tartrato sódico 100mM, pH 4,5. El volumen de la mezcla reactiva fue de 1mL, 200 μ L de tartrato de sódico, 50 μ L de 2,6-DMP, 600 μ L de extracto de muestra 50 μ L MnSO_4 y 100 μ L H_2O_2 . Gonzales et al., (2003). Se determinó a una absorbancia de 468nm. Por cada tratamiento se realizó un triplicado. Además, esta enzima se determinó a 0, 3 y 5 minutos de formada la reacción. Esto se realizó para observar si variaba la expresión de la enzima al cabo de los distintos tiempos.

3.5.3 Actividad de β -glucosidasa

Esta actividad fue determinada usando como sustrato enzimático 4-nitrophenyl β -D-Glucopyrenoside (p-NPG). En tubos eppendorf de 1,5 mL se agregaron 400 μ L de p-NPG y 100 μ L del extracto fúngico. Se incubaron los tubos a baño María a 50°C durante 20 minutos, luego

de esto se les adicionó 1000 μL de carbonato de sodio para detener la reacción, las muestras se leyeron a 410nm en el espectrofotómetro.

3.6 Análisis estadístico

Se usaron 5 técnicas estadísticas para analizar los resultados de este estudio. Para todos los análisis se utilizó el programa estadístico SPSS 10.

3.6.1 Análisis de la varianza unifactorial

Los datos obtenidos para las distintas situaciones de partida sobre cada una de las variables analizadas, y para cada uno de los muestreos realizados, 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 (cada etapa de muestreo). Cuando $p < 0.05$ se realizó la prueba post-hoc de Tukey para determinar la significación estadística de las diferencias obtenidas (Cornejo, 2006).

3.6.2 Análisis multivariante

Para obtener el efecto del factor influyente sobre las medias de las agrupaciones de una distribución conjunta de variables dependientes se realizó un análisis de varianza multivariante. Se analizaron así mismo las interacciones entre las variables analizadas (Cornejo, 2006).

3.6.3 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 análisis factorial con extracción de componentes principales. Dos componentes que explicaban más del 80 % de la varianza total fueron obtenidas.

3.6.4 Análisis de correlaciones

La dependencia lineal de las variables de respuesta obtenidas fue analizada mediante análisis de correlación utilizando el coeficiente de correlación de Pearson para establecer las relaciones entre las variables.

3.6.5 Análisis de conglomerados

Los datos obtenidos como componentes principales fueron, adicionalmente, utilizados para clasificar las distintas unidades experimentales y formar grupos de tratamientos de comportamiento similar. Para esto, se realizó un análisis de conglomerados no jerárquico, obteniéndose 4 grupos de tratamientos, según el método de agrupación de Ward.

4. PRESENTACION DE RESULTADOS Y DISCUSION

A continuación se presentan los resultados obtenidos para las variables analizadas, diferenciando los tratamientos en base a las especies de hongo inoculadas, los aditivos aplicados y sus tiempos de aplicación.

4.1 pH

Como se observa en los gráficos A1, A2, B1 y B2 de la Figura 4, se registró un aumento en los valores de pH a medida que se avanzaba en la duración del proceso de compostaje. Como valores extremos, se observó un aumento en los valores de pH de 3,42 en el día 0 a 8,53 al día 126 cuando se consideró la aplicación de Al_2O_3 en los tratamientos inoculados con *C. rigida*, aplicado al final del estudio.

En general, se observó una tendencia mantenida del aumento de los valores de pH a medida que transcurría el tiempo de compostaje. Así, el valor de pH más alto fue de 9,14 en el día 126 en tratamientos donde se inoculó el hongo *P. ostreatus*. Según García (1991) el pH óptimo de crecimiento del micelio de *P. ostreatus* fluctúa entre 5,5 y 6,5, siendo una variable fundamental en el crecimiento de los hongos. Como media global, se puede añadir que en este estudio el valor de pH fue de 7,7.

Adicionalmente, como se observa en los gráficos C1, C2, D1 y D2 de la Figura 4, fue posible observar un aumento del pH conforme avanza el periodo de evaluación. Este aumento en los valores de pH se puede atribuir a un aumento de las bases intercambiables (Valarini et al., 2009). En particular, cuando se evaluó la adición de Al_2O_3 (ver gráficos C1 y D1, Figura 4 se observó un aumento progresivo del pH. En D1 el pH fluctuó entre 6 y 8,8 a excepción de los tratamientos con adición de Al_2O_3 y control en el tiempo 0 días, importante diferencia considerando que estos tratamientos comenzaron con valores de pH muy bajo.

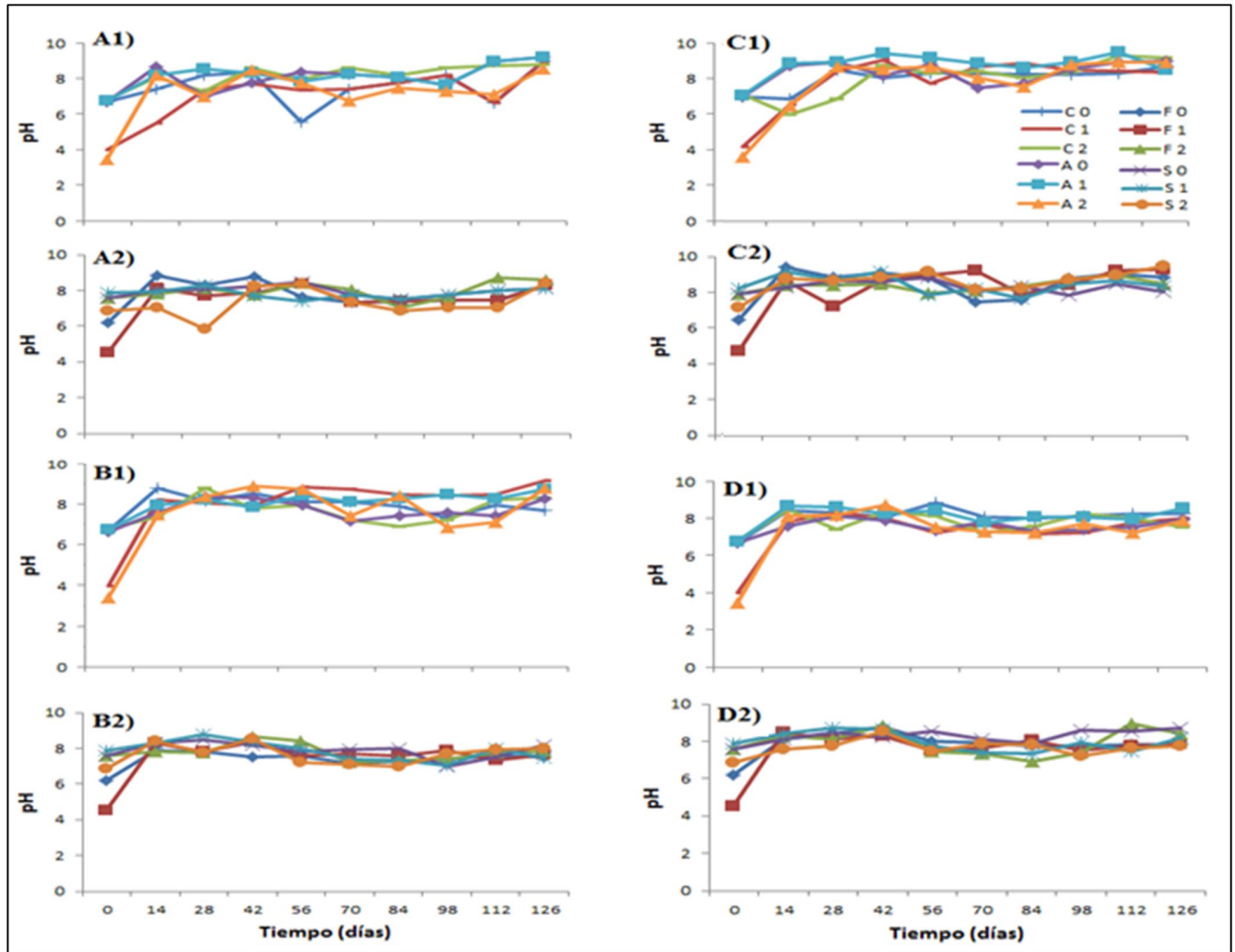


Figura 4. Evolución del valor de pH para el residuo de paja de trigo compostado por los hongos *Coriolopsis rigida* (A1, A2), *Pleurotus ostreatus* (B1, B2), *Trametes versicolor* (C1, C2) y *Trichoderma harzianum* (D1, D2), con utilización de aditivos químicos y distintos tiempos de aplicación. Leyenda: C 0-control día 14, C 1-control día 70, C 2-control día 112; A 0-óxido de aluminio aplicado día 14, A 1-óxido de aluminio aplicado día 70, A 2-óxido de aluminio aplicado 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.

4.2 Actividad lacasa

En la Figura 5 se presentan los valores de las medias globales (luego de realizado el análisis de las medias repetidas) para la actividad de la enzima lacasa. Los valores más altos para esta actividad los presentó *T. versicolor* en varios de los tratamientos de aplicación de aditivos y tiempos de aplicación. Según Coello (2011) los hongos que se han identificado con mayores potencialidades de biorremediación de suelos contaminados son *Phanerochaete chrysosporium*, *T. versicolor* y *Pleurotus spp.* Por el contrario, los valores más bajos para esta variable se observaron en los tratamientos inoculados con el hongo *T. harzianum*. De todas formas, el mejor aditivo en este hongo en particular fue Al_2O_3 aplicado el día 70 del proceso de compostaje.

En la Figura 5 se muestra la evolución temporal de la actividad lacasa. Cabe mencionar que el aditivo que, en términos generales, favoreció mayores actividades lacasa fue Fe_2O_3 , en particular cuando fue aplicado en el día 70, seguido por Al_2O_3 en el día 112 y suelo en el día 112 en la cepa *T. versicolor*. En tanto *C. rigida* y *P. ostreatus* de la Figura 6 se observa un aumento de la actividad de esta enzima a través del tiempo. Puntualmente, cabe destacar que como se observa en el gráfico A2 (*C. rigida*), el aditivo S2 (suelo aplicado el día 112), hacia el final del periodo, la actividad lacasa registró una marcada disminución. En contraposición a lo observado en términos globales (Figura 5), F1 en *C. rigida* (Figura 6) registró una disminución constante en la actividad de esta enzima. En el gráfico B1, Al_2O_3 aplicado en el día 70 generó un aumento de la actividad, que fue máxima a los 126 días del proceso de compostaje.

En la Figura 6, *T. versicolor*, se registró un aumento marcado de esta actividad comparado con las otras tres especies de hongos, destacando por sobre todas Fe_2O_3 aplicado al día 14 del proceso de compostaje (al inicio del mismo). Este aspecto podría ser muy importante, porque aunque la finalidad de la aplicación de este óxido era la formación de complejos organometálicos más estables en el proceso de compostaje, este aditivo podría estar ejerciendo un efecto catalítico sobre la función de esta enzima en particular. También el tratamiento con Fe_2O_3 en el hongo *T. harzianum* mostró una marcada actividad, la que sin embargo fue bastante irregular en comparación con *T. versicolor*. En el *T. harzianum* de la Figura 6 se observa igualmente que el tratamiento F0 generó una actividad marcadamente alta, pero sólo hasta el día 42 del estudio, desde cuando comienza un descenso constante de la actividad enzimática.

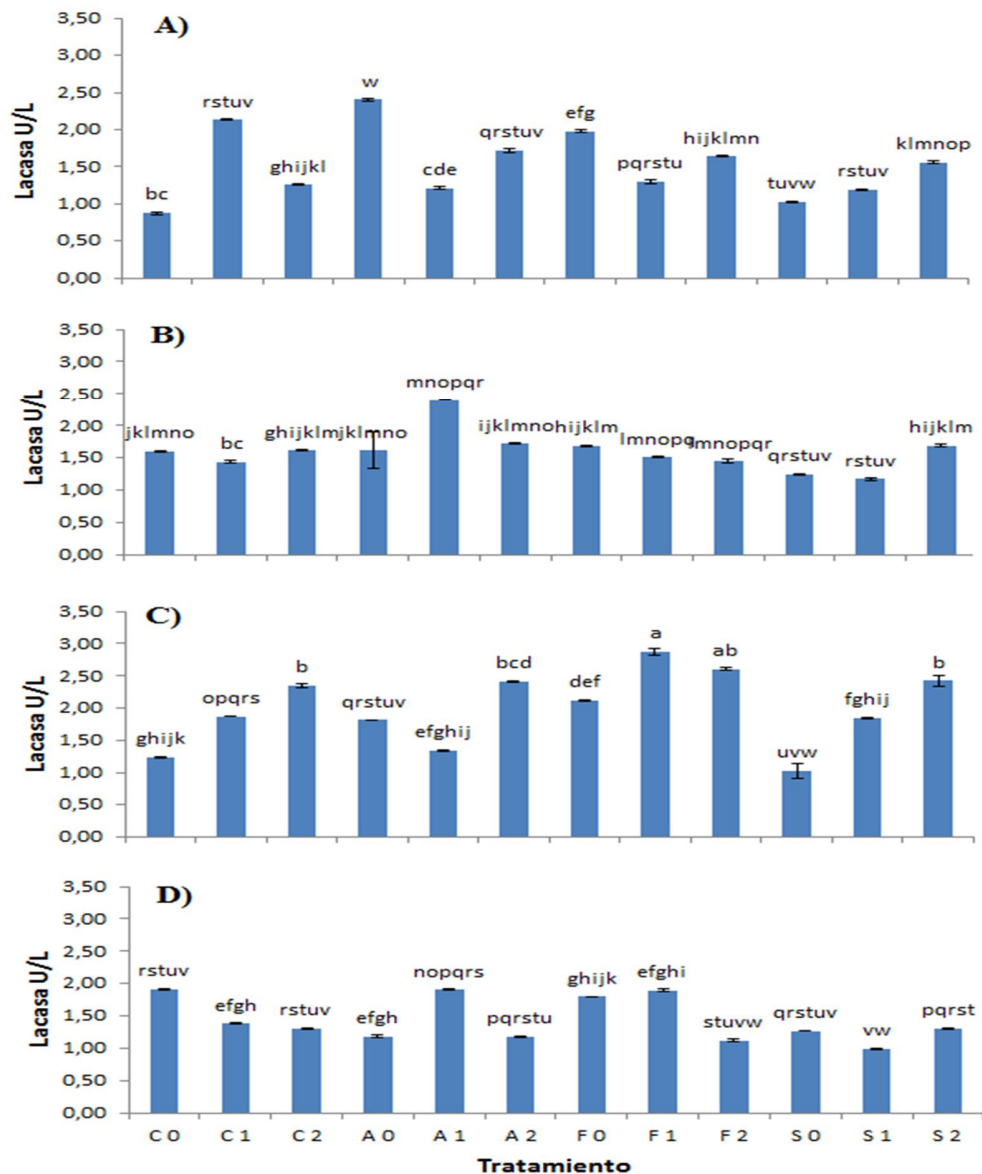


Figura 5. Actividad media de la enzima Lacasa (U L^{-1}) en un compostaje de paja de trigo por los hongos *Coriopsis rigida* (A), *Pleurotus ostreatus* (B), *Trametes versicolor* (C) y *Trichoderma harzianum* (D), con utilización de aditivos químicos y distintos tiempos de aplicación. Tratamientos: C 0-control día 14, C 1-control día 70, C 2-control día 112; A 0-óxido de aluminio aplicado día 14, A 1-óxido de aluminio aplicado día 70, A 2-óxido de aluminio aplicado 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. Letras distintas indican diferencias significativas de las medias (Tukey $P < 0,05$).

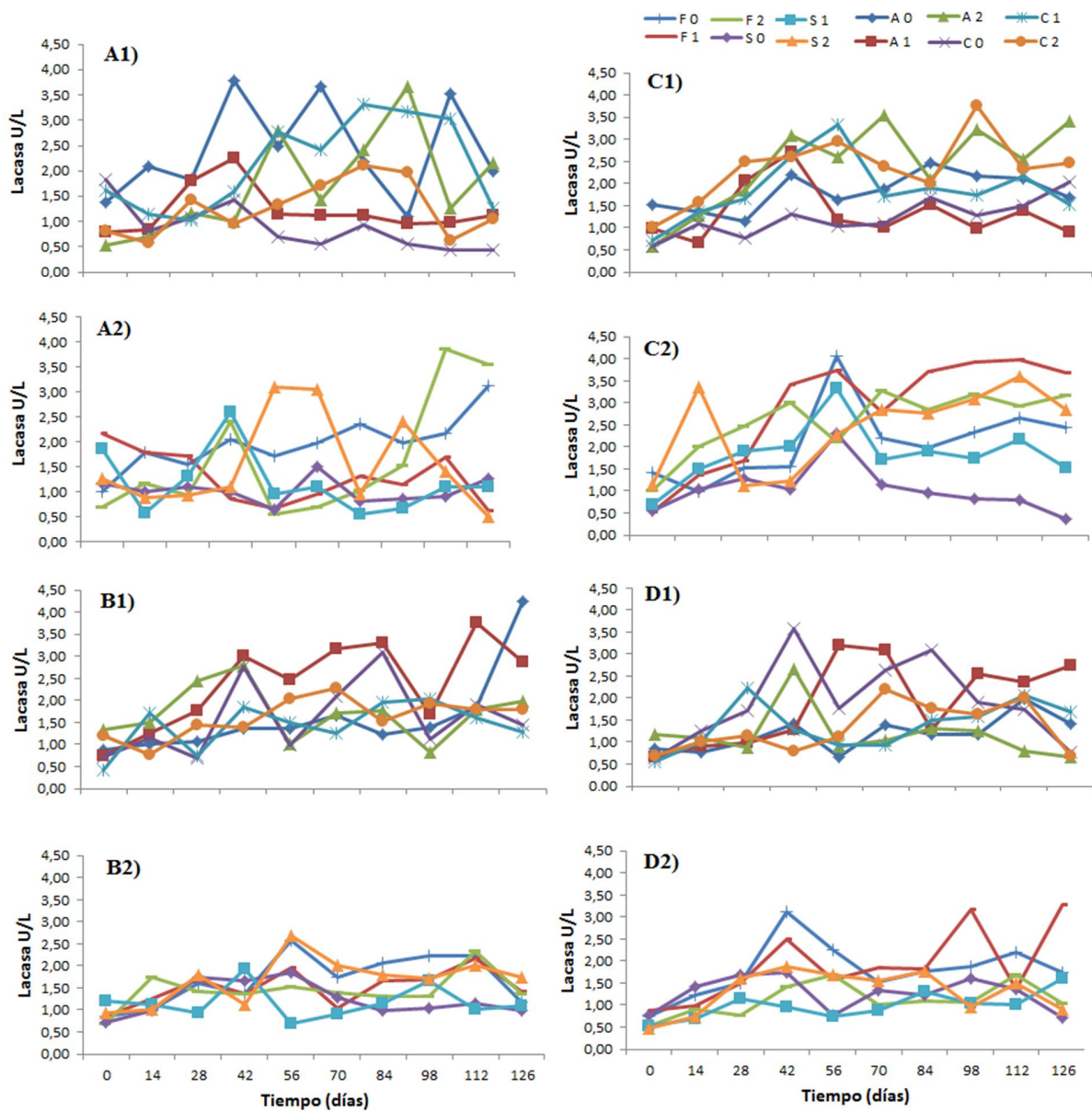


Figura 6. Evolución de la enzima Lacasa en $U L^{-1}$ para residuos compostado por los hongos *Coriopsis rigida* (A1, A2), *Pleurotus ostreatus* (B1, B2), *Trametes versicolor* (C1, C2) y *Trichoderma harzianum* (D1, D2), con utilización de aditivos químicos y distintos tiempos de aplicación. Leyenda: C 0-control día 14, C 1-control día 70, C 2-control día 112; A 0-óxido de aluminio aplicado día 14, A 1-óxido de aluminio aplicado día 70, A 2-óxido de aluminio aplicado 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.

En el sentido contrario, los menores valores para esta actividad se registraron en los tratamientos con el hongo *T. harzianum*. Según Romero et al., (2009) *T. harzianum*, produce enzimas hidrolíticas que degradan componentes de la pared celular de muchos organismos, que luego pueden ser utilizados como fuente de nutrientes. Sin embargo, enzimas con capacidad ligninolítica no han sido descritas en este hongo, por lo que los valores encontrados en estos tratamientos son atribuibles a las poblaciones naturales de microorganismos que colonizaron el sustrato.

4.3 Enzima manganeso peroxidasa (MnP)

En la Figura 7 se presentan los valores de las medidas repetidas a lo largo del estudio para la enzima MnP. Nuevamente, los valores más altos los presenta *T. versicolor* y los más bajos *T. harzianum*, que se explica por los mismos hechos que los descritos para el caso de la lacasa (Romero et al., 2009). Cabe mencionar que el aditivo Fe_2O_3 aplicado el día 70 tuvo diferencias significativas comparado con los otros dos, coincidiendo con los valores de la enzima lacasa; seguido por Fe_2O_3 aplicado en el día 112 y suelo en el día 112, todos éstos pertenecientes al hongo *T. versicolor* (ver Figura 7). Adicionalmente, también *C. rigida* presentó valores altos para esta actividad, pero también fue bastante efectiva la adición de Al_2O_3 (y Fe_2O_3) aplicado el día 14 del estudio. Fue destacable también que el hongo *T. versicolor* generó diferencias significativas respecto de los otros hongos para esta actividad enzimática.

En la Figura 8 se muestra la evolución en el tiempo de la actividad MnP. Puntualmente, para *C. rigida* se observa un comportamiento bastante irregular de la actividad para los tratamientos A0 y A2, el tratamiento F2 presentó una marcada actividad en el último periodo. Por otra parte, *P. ostreatus* después de aplicado el segundo tratamiento, hubo una disminución de la actividad enzimática en todos los aditivos. Para *P. ostreatus* (gráfico B1) en el día 84 se presentó un aumento considerable de la actividad de esta enzima hasta el día 112, y después de aplicada la última dosis se observó una marcada disminución.

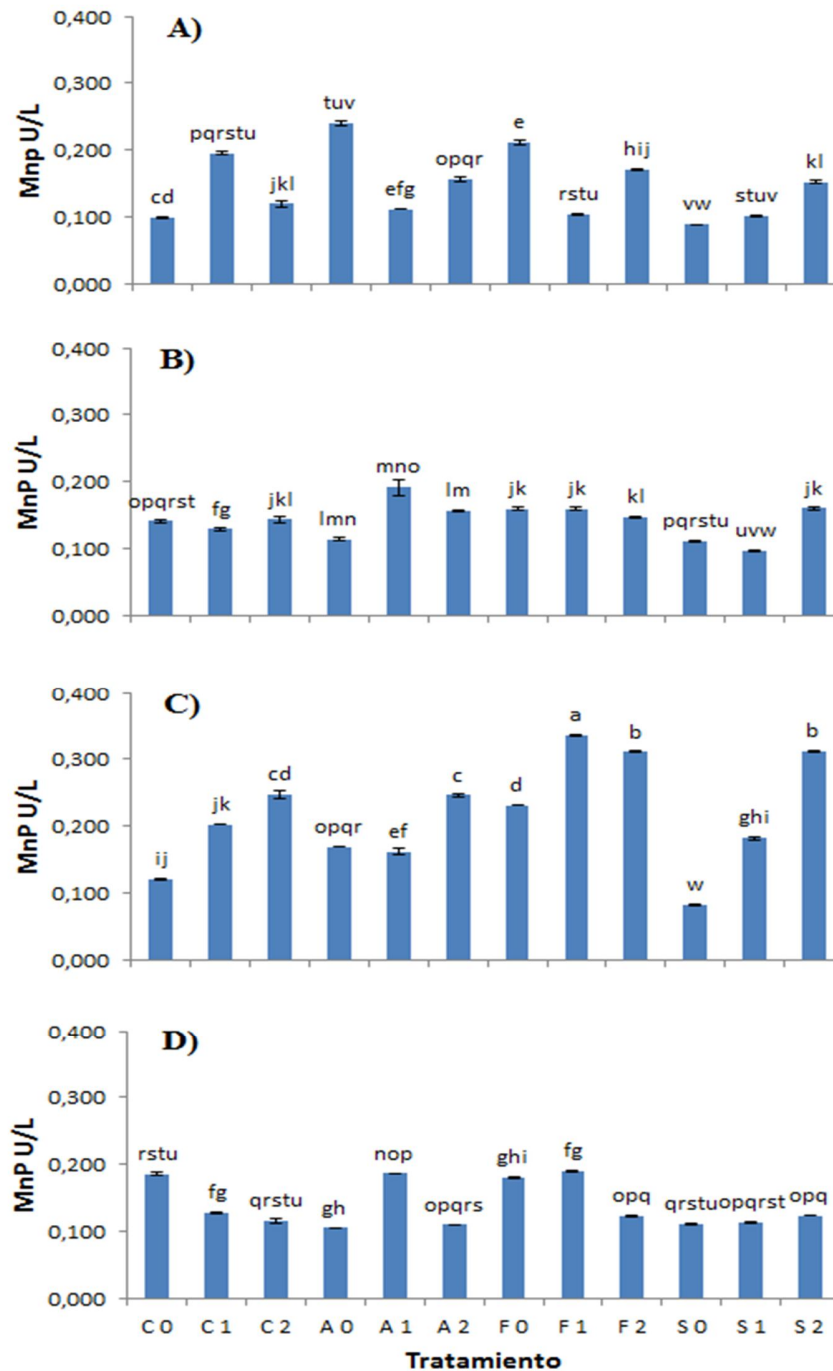


Figura 7. Actividad media de la enzima MnP (U L^{-1}) en un compostaje de paja de trigo por los hongos *Coriopsis rigida* (A), *Pleurotus ostreatus* (B), *Trametes versicolor* (C) y *Trichoderma harzianum* (D), con utilización de aditivos químicos y distintos tiempos de aplicación. Tratamientos: C 0-control día 14, C 1-control día 70, C 2-control día 112; A 0-óxido de aluminio aplicado día 14, A 1-óxido de aluminio aplicado día 70, A 2-óxido de aluminio aplicado 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. Letras distintas indican diferencias significativas de las medias (Tukey $P < 0,05$).

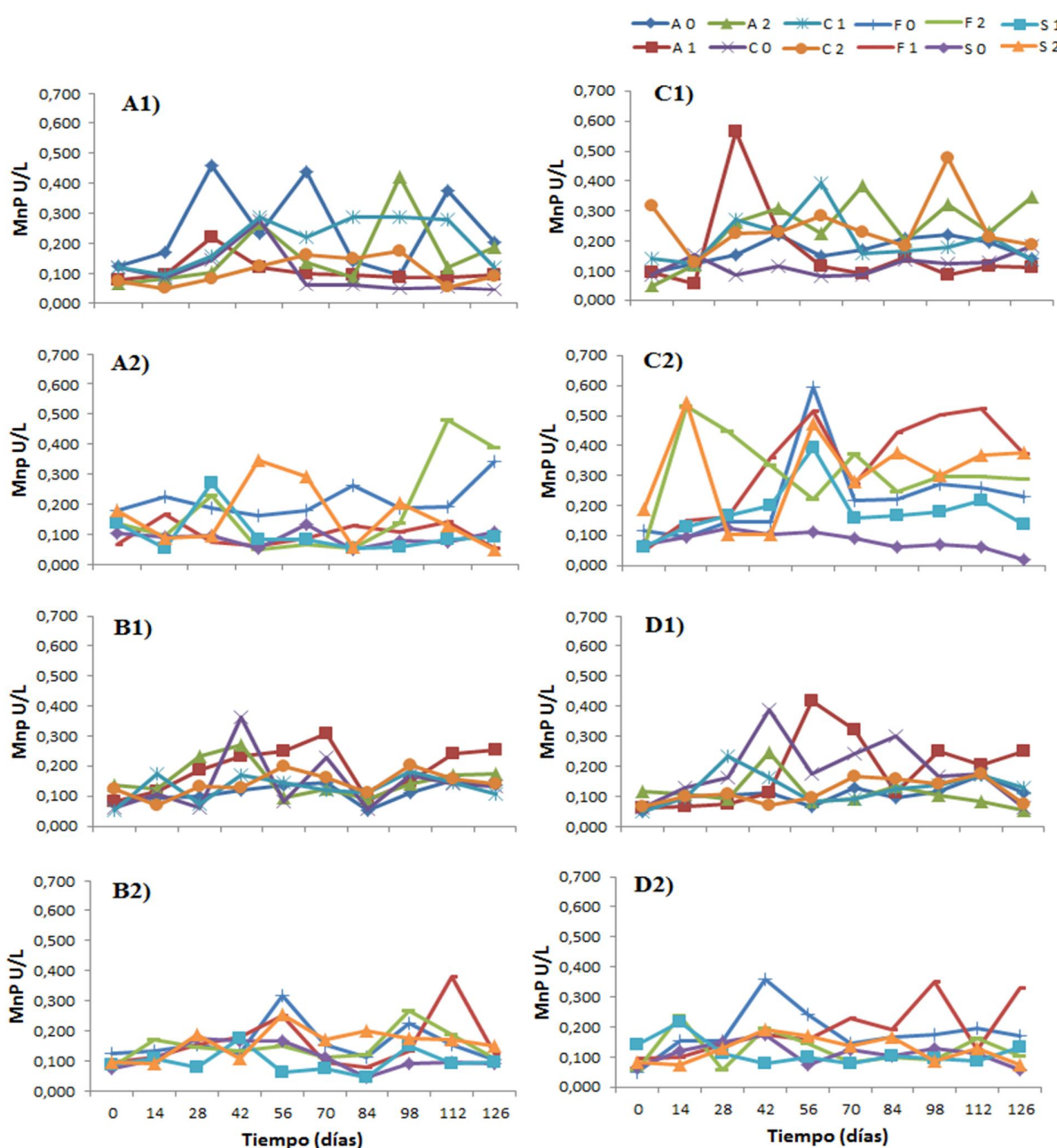


Figura 8. Evolución de la enzima MnP en U L^{-1} para residuos compostado por los hongos *Coriolopsis rigida* (A1, A2), *Pleurotus ostreatus* (B1, B2), *Trametes versicolor* (C1, C2) y *Trichoderma harzianum* (D1, D2), con utilización de aditivos químicos y distintos tiempos de aplicación. Leyenda: C 0-control día 14, C 1-control día 70, C 2-control día 112; A 0-óxido de aluminio aplicado día 14, A 1-óxido de aluminio aplicado día 70, A 2-óxido de aluminio aplicado 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.

En la Figura 8 se muestra una irregular actividad MnP a lo largo del estudio. En *T. versicolor* en el aditivo Al_2O_3 aplicado al día 70 mostró un fuerte aumento de la actividad hasta el día 28, donde se generó una marcada inflexión y una posterior disminución de la actividad. Por su parte, *T. versicolor* (gráfico C2) en el día 70 se produjo una disminución de la actividad, pero luego de ese punto se produjo un aumento considerable dentro de los tratamientos.

4.4 Enzima beta-glucosidasa

En la Figura 9 se presentan los valores medios globales de la actividad beta-glucosidasa. Las actividades más altas las presentó *T. versicolor* y las más bajas *T. harzianum*, en concordancia con las demás actividades antes descritas. Cabe mencionar que el aditivo que mayores incrementos generó en esta actividad en particular fue el Al_2O_3 , cuando fue aplicado en el día 14 y suelo aplicado en el día 112 del proceso de compostaje, seguido por Al_2O_3 aplicado en el día 112, en todos los casos en los tratamientos donde se inoculó el hongo *T. versicolor*. Importante destacar que para esta actividad en particular el hongo *T. versicolor* (como factor principal -hongo-) posee diferencias estadísticas significativas respecto de los otros hongos.

Coriopsis rigida también presentó una alta actividad enzimática, aunque más puntualmente en los tratamientos donde se usó como aditivo A0, F0, C1, y S1. Por otra parte, en la Figura 10 se puede observar que se produjo una actividad enzimática que fue bastante irregular a lo largo del tiempo, dentro de los 126 días para todos los hongos, pero en particular para *C. rigida*, donde la actividad comenzó siendo alta desde el día 0, para luego en el día 14 bajar de forma drástica. Para *P. ostreatus* la actividad fue alta inicialmente, para luego igualmente bajar de forma constante dentro de todo el periodo hasta el final del estudio. En la Figura 10, *T. versicolor* presentó una disminución de la actividad durante el tiempo, destacando también que *T. harzianum* comenzaron siendo altas y bajaron su actividad desde el día 14, para luego volver a presentar incrementos en la actividad a medida que transcurrió el tiempo.

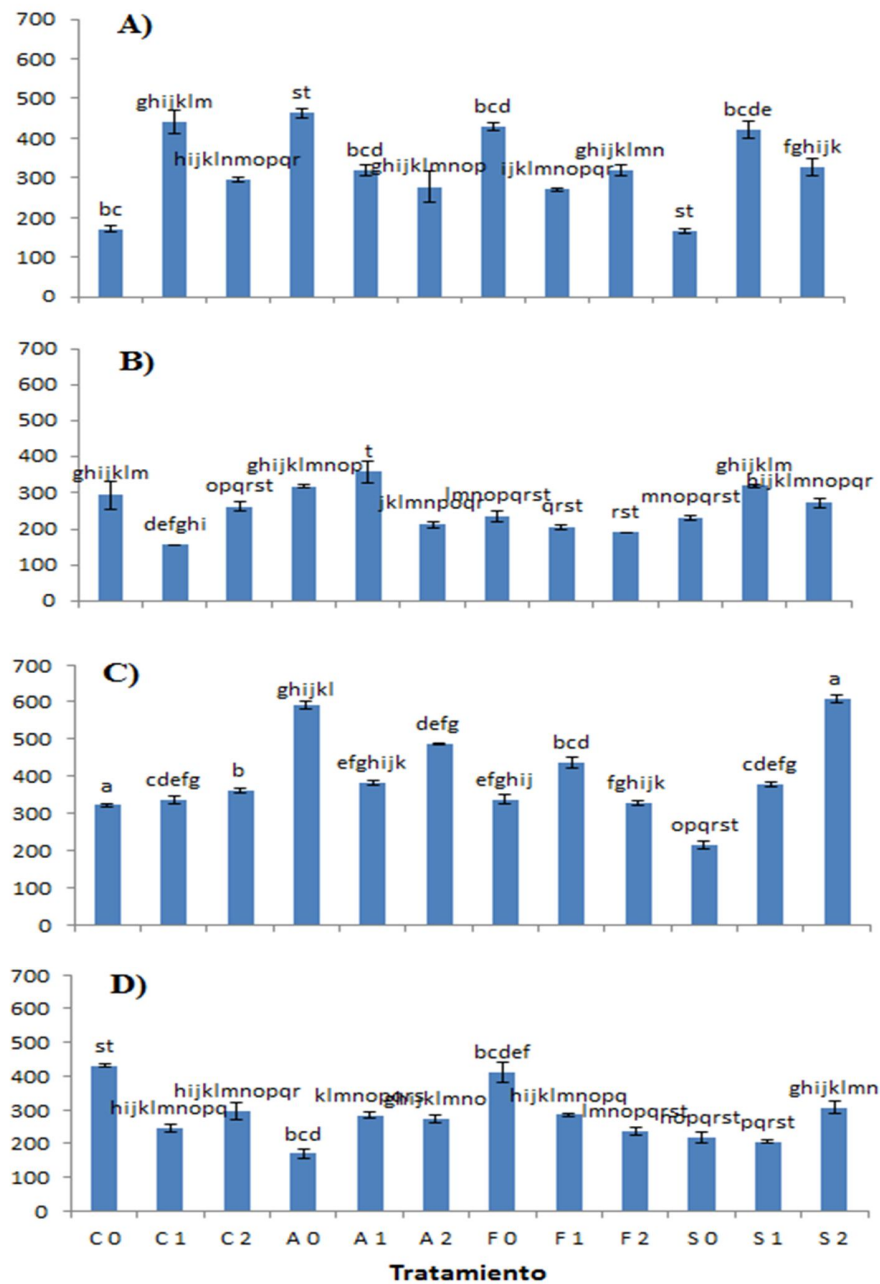


Figura 9. Actividad media de la enzima Beta-Glucosidasa en $\mu\text{mol PNG g}^{-1} \text{h}^{-1}$ en un compostaje de paja de trigo por los hongos *Coriolopsis rigida* (A), *Pleurotus ostreatus* (B), *Trametes versicolor* (C) y *Trichoderma harzianum* (D), con utilización de aditivos químicos y distintos tiempos de aplicación. Tratamientos: C 0-control día 14, C 1-control día 70, C 2-control día 112; A 0-óxido de aluminio aplicado día 14, A 1-óxido de aluminio aplicado día 70, A 2-óxido de aluminio aplicado 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. Letras distintas indican diferencias significativas de las medias (Tukey $P < 0,05$).

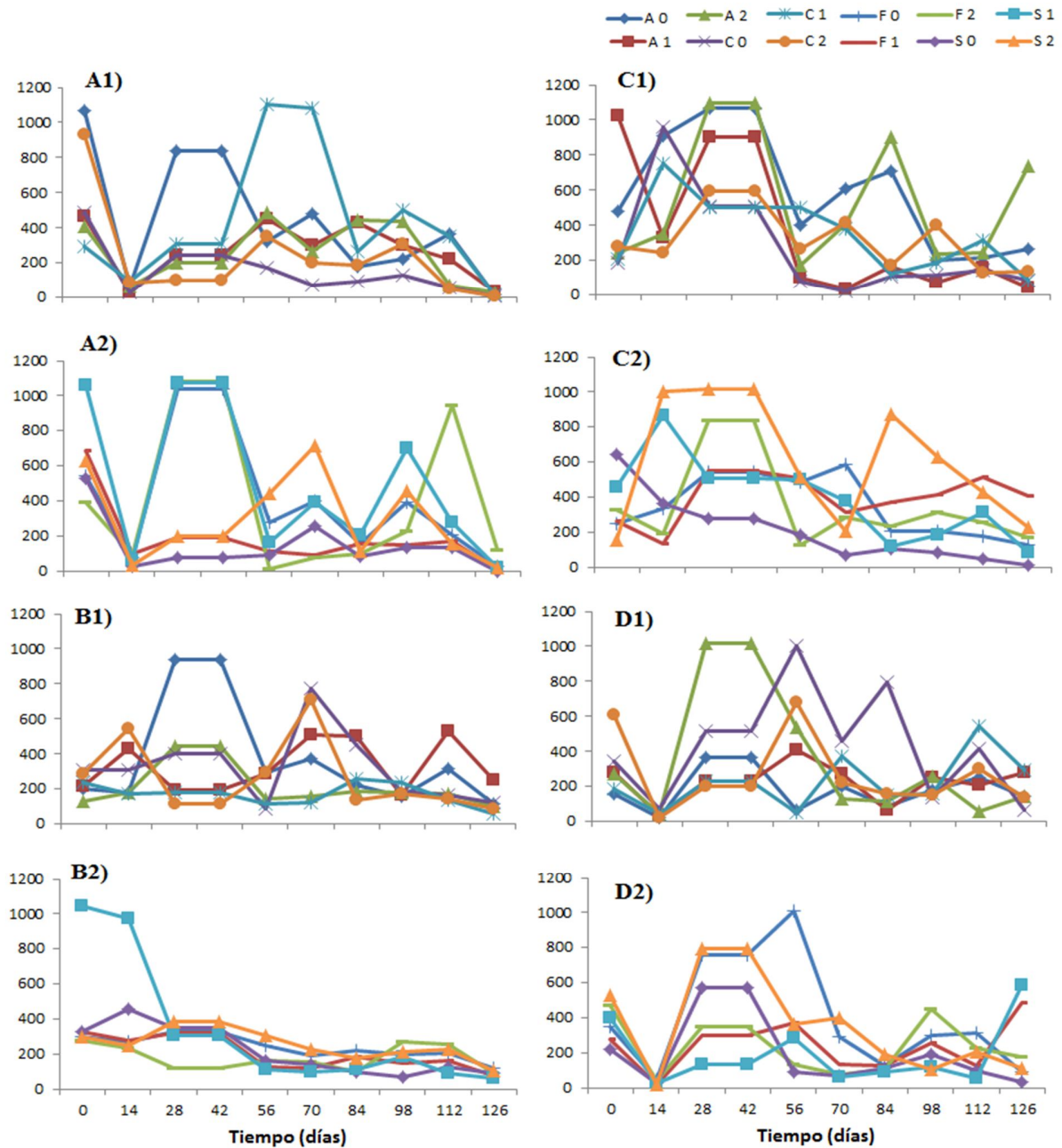


Figura 10. Evolución de la enzima Beta-Glucosidasa en $\text{umol PNG g}^{-1} \text{h}^{-1}$ para residuos compostado por los hongos *Coriopsis rigida* (A1, A2), *Pleurotus ostreatus* (B1, B2), *Trametes versicolor* (C1, C2) y *Trichoderma harzianum* (D1, D2), con utilización de aditivos químicos y distintos tiempos de aplicación. Leyenda: C 0-control día 14, C 1-control día 70, C 2-control día 112; A 0-óxido de aluminio aplicado día 14, A 1-óxido de aluminio aplicado día 70, A 2-óxido de aluminio aplicado 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.

4.5 Análisis de conglomerados y correlaciones

En la Figura 11 se presentan los resultados para el análisis de conglomerados de las distintas combinaciones hongo/aditivo/tiempo de aplicación utilizadas. El análisis arrojó la conformación de cuatro grupos de tratamiento similares, en el cual el primero de ellos posee 14 tratamientos en total, donde se concentran preferentemente tratamientos con *T. versicolor* (7 en total), en particular con adición de suelo alofánico. Otra especie que resultó bastante similar en forma global a *T. versicolor* fue *P. ostreatus*, que ocupó 5 de los 14 tratamientos agrupados en este conglomerado. Cabe destacar igualmente que la mitad de los aditivos de este cluster son con uso de suelo alofánico como aditivo. Cabe destacar que estos conglomerados se establecieron utilizando como variables de clasificación las dos primeras componentes principales utilizadas del análisis factorial. Estas componentes presentaron una alta relación lineal con las actividades enzimáticas, en particular Lacasa y MnP, por lo que se puede asumir que son los tratamientos o que en mayor medida presentaron actividades ligninolíticas destacables. Por el contrario, existen dos cluster donde se concentra una gran cantidad de tratamientos de *T. harzianum*, que corrobora igualmente las menores actividades enzimáticas de este hongo.

Finalmente, en el Cuadro 2 se presentan las correlaciones lineales entre las variables analizadas. En particular, se observa una muy alta correlación entre ambas actividades ligninolíticas ($r=0,945$; $p<0,001$), que sugiere la presencia de especies de hongos más eficientes en el proceso de degradación de los materiales lignocelulósicos por una mayor actividad de estas dos enzimas de forma conjunta. Respecto del pH, aunque con un valor r mucho menor, el pH también correlacionó de forma positiva con estas enzimas, lo que se puede deber a la prolongación del tiempo de estudio, y la correlación sólo con las medias globales, ya que de forma puntual es bien sabido que las mayores actividades de estas enzimas se da a pH fuertemente ácidos. La actividad beta-glucosidasa por el contrario, no se relacionó con ningún otro parámetro analizado.

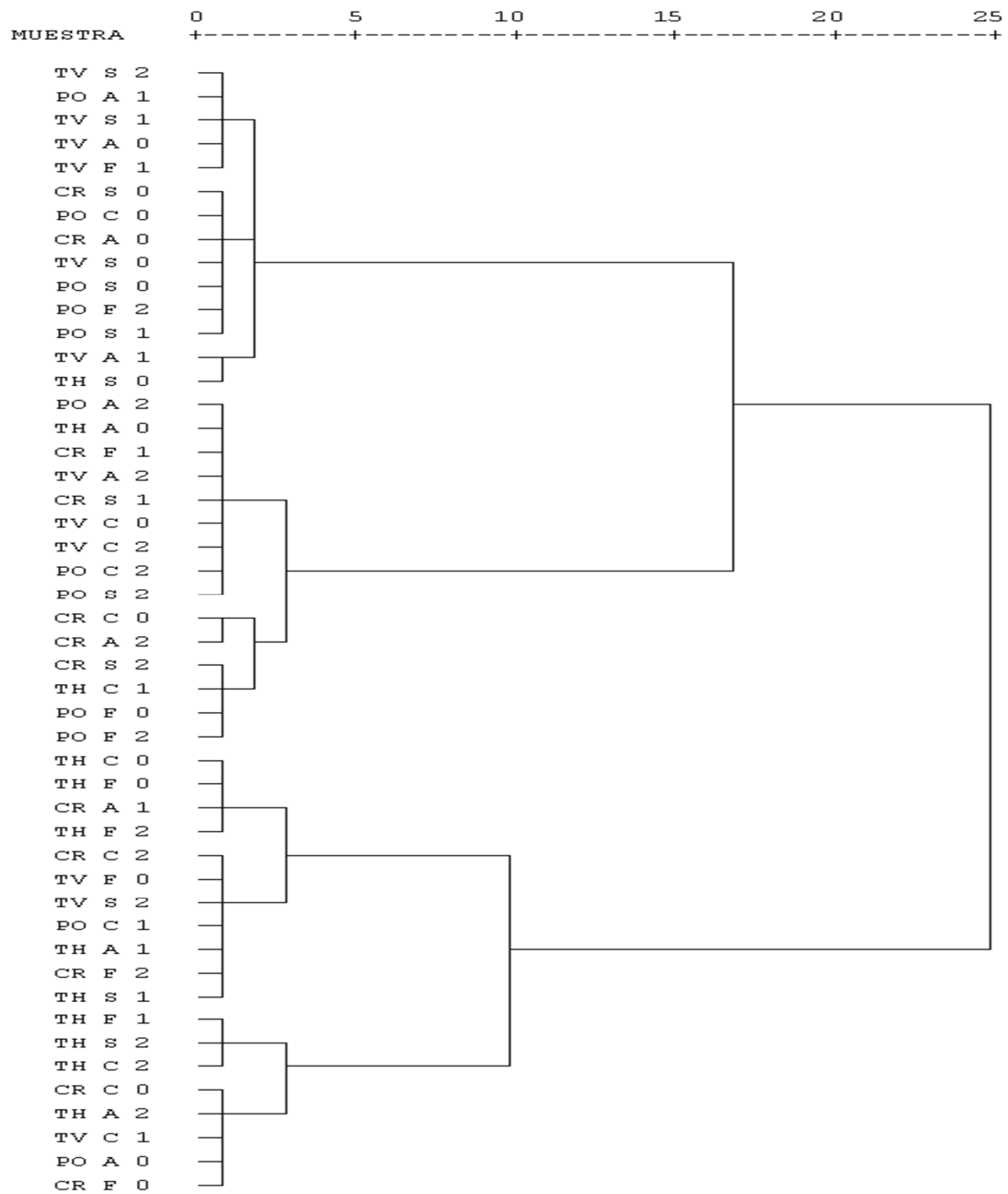


Figura 11. Análisis de conglomerados jerárquicos para las variables del estudio en los distintos tratamientos con uso de los hongos *Coriolopsis rigida* (CR), *Pleurotus ostreatus* (PO), *Trametes versicolor* (TV) y *Trichoderma harzianum* (TH), con utilización de aditivos químicos y distintos tiempos de aplicación. Leyenda: C 0-control día 14, C 1-control día 70, C 2-control día 112; A 0-óxido de aluminio aplicado día 14, A 1-óxido de aluminio aplicado día 70, A 2-óxido de aluminio aplicado 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.

Cuadro 2. Matriz de correlaciones lineales entre las diferentes enzimas analizadas lacasa, manganeso peroxidas, Beta glucosidasa y pH.

Matriz de correlaciones^a

		LACASA	MNP	PH	BETA
Correlación	LACASA	1,000	,945	,642	-,116
	MNP	,945	1,000	,624	-,120
	PH	,642	,624	1,000	-,266
	BETA	-,116	-,120	-,266	1,000
Sig. (Unilateral)	LACASA		,000	,000	,216
	MNP	,000		,000	,207
	PH	,000	,000		,034
	BETA	,216	,207	,034	

a. Determinante = 5,777E-02

5. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos, y al análisis de los datos, se puede observar claramente que la posibilidad de mejorar la transformación de restos de cosecha de cereales para ser utilizados como enmienda en suelos puede ser basada en el uso conjunto de herramientas químicas, como la aplicación de compuestos químicos que pueden actuar como catalizadores o estabilizantes, en conjunto con organismos con conocida actividad lignocelulósica. En lo particular, del desarrollo de esta tesis se puede concluir que:

-) La especie de hongo que promovió los mejores resultados en actividades degradativas de la paja de trigo fue *Trametes versicolor*, seguido por *Pleurotus ostreatus*, que demuestra la factibilidad de usar ecotipos autóctonos como los que están disponibles a nivel comercial para potenciar procesos de compostaje de residuos con altas relaciones carbono/nitrógeno.
-) El compuesto químico que presentó mayores incrementos en las actividades enzimáticas, en especial lacasa y manganeso peroxidasa, fue Fe_2O_3 , en particular cuando se aplicó el día 70 de duración del proceso de compostaje. Adicionalmente, el suelo alofánico utilizado como aditivo, también presentó importantes incrementos de las actividades enzimáticas en todos los tiempos de aplicación.
-) La utilización de *T. versicolor* en conjunto con alguna alternativa de aditivo (óxido o suelo alofánico) podría ser una de las más apropiadas alternativas para mejorar el proceso de compostaje de restos vegetales con altos contenidos de ligninas y celulosas.
-) Por último, la irregular evolución temporal de las actividades enzimáticas limitó su uso como índice de eficiencia de compostaje, por lo que requiere ser complementado con la determinación de sustancias húmicas formadas en el proceso.

6. RESUMEN

La utilización de hongos degradadoras de materiales ricos en lignina y celulosa, en conjunto con el uso de estabilizantes químicos, surge como una alternativa para el manejo de desechos agrícolas, con la finalidad de obtener materiales compostados para ser utilizados como enmiendas en suelos agrícolas o en recuperación de suelos degradados. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue analizar la variación temporal de las actividades enzimáticas lignocelulósicas y de actividad microbiana, y determinar su utilidad como indicador de la efectividad de aislados autóctonos de hongos saprobios en procesos de compostaje de residuos de cosecha de cereales producidos en el sur de Chile. Para esto se utilizaron aislados de cuatro especies de hongos: *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Pleurotus ostreatus* y *Coriolopsis rigida*, los que fueron adicionados o no estabilizantes químicos (óxidos de hierro o aluminio y arcillas alofánicas), los que se incorporaron al cabo de 2, 10 ó 16 semanas de iniciado el proceso de compostaje. Se evaluaron tres actividades enzimáticas: lacasa, manganeso peroxidasa y beta-glucosidasa. Los resultados mostraron que *T. versicolor* presentó los valores más altos para la actividad lacasa y manganeso peroxidasa en la mayoría de los tratamientos de aplicación de aditivos y tiempos en que fueron aplicados. Tanto óxido de hierro como suelo alofánico promovieron mayores actividades durante el proceso de compostaje. Una alta correlación entre la actividad de las enzimas lacasa y MnP fue encontrada ($r=0,945$; $p<0,001$). El análisis de conglomerados mostró una alta homogeneidad en los resultados globales presentados por los tratamientos con *T. versicolor* con adición de suelo alofánico y óxido de aluminio, siendo el grupo que presentó las mayores actividades de forma global durante todo el experimento. Estos resultados sugieren que la adición de algunos compuestos químicos puede incrementar la actividad degradativa de las enzimas lignocelulósicas, que es de vital importancia en la mineralización y estabilización de residuos con altos contenidos de estos componentes orgánicos, como paso previo a procesos de humificación y su aplicación al suelo.

7. SUMMARY

The use of lignin and cellulose degrading fungi, together with the use of chemical stabilizers arise as an alternative for the handling of agricultural wastes in order to obtain composted materials to be used as amendments in agricultural soils or with the aim to restore degraded soils. Therefore, the aim of this study was to analyze the time-course variation of lignocellulosic enzyme and microbial activity, to evaluate its usefulness as an indicator of the effectiveness of native saprobe fungal strains in composting processes using cereal crop residues produced in southern Chile. For this, strains of four fungi species: *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Pleurotus ostreatus* and *Coriolopsis rigida* were used in a composting process, added or not with chemical stabilizers (aluminum or iron oxides and allophanic clays), which were incorporated after 2, 10 or 16 weeks of the initiation of the composting process. Three enzymatic activities: laccase, manganese peroxidase and beta-glucosidase were evaluated. The results showed that *T. versicolor* present the higher values for manganese peroxidase and laccase activities in the most of treatments and additives application irrespective of the time at which the additives were applied. Both iron oxides as allophane soil promoted high activities during the composting process. A high correlation between the activity of laccase and MnP enzymes was found ($r = 0.945$, $p < 0.001$). The cluster analysis showed a high homogeneity in the overall results presented by *T. versicolor* treatments with addition of allophanic soil and aluminum oxide, being the group with the highest mean activities throughout the experiment. These results suggest that the addition of some chemicals compounds can increase the degradation activity of lignocellulosic enzymes, which is highly important in the mineralization and stabilization of wastes with high content of these organic components, as a prior step to the humification processes and its application to the soil.

8. LITERATURA CITADA

- Aranda, El.,** 2006. Fraccionamiento físico del alpeorajo 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.
- Arévalo, M.,** 2006. Estudio de la actividad β -Glucosidásica en levaduras vínicas y su aplicación en enología. Tesis doctoral. Universidad de Castilla-La Mancha. España. 16p
- Aro, N., Pakula, T., Penttilä, M.,** (2005). Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. FEMS Microbiol. Rev. 29: 719–739.
- Calabi-Floody, M., Bendall, J.S., Jara, A.A., Welland, M.E., Theng, B.K.G., Rumpel, C., Mora, M.L.** 2011. Nanoclays from an Andisol: Extraction, properties and carbon stabilization. Geoderma 161: 159-167.
- CEPAL,** 2012. (Comisión Económica para América latina y el Caribe). Población, territorio y desarrollo sostenible.
- Coello, J.,** 2011. Aplicación del hongos *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. 29-92p
- Dávila, G., Vázquez, R.,** 2006. Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. 38p
- Díaz, R.,** 2010. Caracterización y papel bioremediador de la lacasa producida por el hongo lignolítico *Coriolopsis rigida* en alpeorajo. Tesis doctoral. Universidad de Granada. España. 31p.
- Eriksson, K., Blanchette, R., Ander, P.,** 1990. Microbial degradation of wood and wood components. Springer-Verlang, Berlín-New York. 407p
- García, M.,** 1991. Cultivo de setas y trufas. Ediciones Mundi-Prensa. Segunda edición. 63-109p.
- Gartzia, N.** 2009. Estructura y dinámica de la materia orgánica del suelo en ecosistemas forestales templados: de lo particular a lo general. Tesis doctoral. Universidad del país Vasco. España. 34-35p

- Gonzales, L., Falcón, M., Perstelo, F.,** 2003. Papel de la lacasa, agentes reductores y sustancias quelantes de Fe^{++} en la degradación de lignina por *Petriellidium fusoideum*. *Amazónica de Investigación Alimentaria*. 2(2): 45-66
- Hammel, K.,** 1997. Fungal degradation of lignin. Institute for Microbial and Biochemical Technology, Forest Products Laboratory, Forest Service, US Department of Agriculture, Madison, WI 53705, USA
- Hetz, E., de la Cerda, J., López, M.,** 2006. Disponibilidad de paja en los rastrojos de trigo en tres provincias de Chile. *Agricultura Técnica (Chile)* 66 (4): 393-401.
- Moreno, N., Ospina, X.,** 2008. Evaluación de inductores metálicos y co-sustratos para la remoción de negro reactivos 5 empleado *Pleutorus ostreatus* inmovilizado en Fique. Tesis de grado, Bogotá. Colombia. 25p
- ODEPA,** 2011. (Oficinas de Estudios y Políticas Agrarias, Ministerios de Agricultura). Boletín del trigo. 2 Producción y consumo mundial de trigo.
- Ovando, C., Waliszewski K.,** 2005 Preparativos de celulasas comerciales y aplicaciones en procesos extractivos. *Universidad y Ciencia*, 21: 111-120.
- Pérez, J., Muñoz, J., de la Rubia, T., Martínez, J.,** 2002. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *Institute Microbiol*, 5: 53-63.
- Poiting, S.,** (2001). Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology* 51: 171-179.
- Preussler, C., Shimizu, E., Villalba, L., Zapata, P.,** 2010. Inducción con cobre de la enzima lacasa en el hongo de pudrición blanca *Trametes villosa* (sw.: Fr.) Kreisel. *Ciencias tecnológicas*. 12p
- Ragauskas, A., Williams, C., Davison, B., Britovsek, G., Carney, J., Eckert, C., Frederick, W., Hallett, J., Leak, D., Liotta, C., Mielenz, J., Murphy, R., Templer, R., Tschaplinski, T.,** 2006. The Path Forward for Biofuels and Biomaterials. *SCIENCE*. 311.
- Romero, O., Damián, M., Domínguez, F., Arellano, D.,** 2009. Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. *Colombia de Biotecnología*. 11(2) 143-151.
- Ruiz, C.** 2011. Alternativas para reducir la quema de rastrojos en las regiones del Centro – Sur de Chile. Instituto de Investigación Agropecuarias, INIA Quilamapu. 43p

- Selvam, K., Swaminathan, K., Chae, K.,** 2003. Decolourization of azo dyes and a dye industry effluent by a white rot fungus *Thelephora* sp.
- Solé, F., Flotats, X.,** 2004. Guía de técnicas de gestión ambiental de residuos agrarios. Proyecto Trama. 94p.
- Tomás, M.,** 2010. Bioetanol de paja de trigo: estrategias de integración de las etapas del proceso. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. España. 135p
- UNFPA,** 2011. (United Nations Population Fund).Estado Población Mundial 2011. 7 mil millones de personas, su mundo sus posibilidades.
- Valarini, P.J., Curaqueo, G., Seguel, A., Manzano, K., Rubio, R., Cornejo, P., Borie, F.** 2009. Effect of compost application on some properties of a volcanic soil from Central South Chile. *Chilean J. Agric. Res.* 69: 416-425.
- Valles, I.** 2006. Estudio de los compuestos lipídicos durante la degradación de la madera de eucalipto por diferentes hongos: transformación de los extraíbles lipofílicos y síntesis de nuevos metabolitos fúngicos. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. España. 8-10p
- Von Lützow, 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.