

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



REUTILIZACION DE RESIDUOS POSTCOSECHA DE TRIGO Y LODOS
INOCULADOS CON *P. Chrysosporium* Y *C. Rígida* COMO ALTERNATIVA
PROMOTORA DEL CRECIMIENTO DE *Eucalyptus globulus* Labill.

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 Forestal.

YOSELINE ANABEL VALENZUELA CORONADO
PROFESOR GUÍA: DR. CESAR ARRIAGADA ESCAMILLA
TEMUCO – CHILE

2010

“REUTILIZACION DE RESIDUOS POSTCOSECHA DE TRIGO Y LODOS RESIDUALES INOCULADOS CON HONGOS LIGNINOLITICOS COMO ALTERNATIVA PROMOTORA DEL CRECIMIENTO DE *Eucalyptus globulus* Labill.”

PROFESOR GUÍA:

.....

CÉSAR ARRIAGADA ESCAMILLA
Ingeniero Forestal
Doctor Ingeniero de Montes
Departamento de Ciencias Forestales
Facultad de Ciencias Agropecuarias y
Forestales
Universidad de la Frontera

PROFESORES CONSEJEROS:

.....

PATRICIO PACHECO CANCINO
Ingeniero Forestal
Ingeniero Civil Industrial
Departamento de Ciencias Forestales
Facultad de Ciencias Agropecuarias y
Forestales
Universidad de la Frontera

.....

PABLO CORNEJO RIVAS
Ingeniero Agrónomo
Doctor en Biología Agraria y
Acuicultura
Departamento de Ciencias Químicas
Facultad de Ingeniería, Ciencias y
Administración
Universidad de la Frontera

CALIFICACIÓN PROMEDIO TESIS:

Capítulo	INDICE	Página
1	INTRODUCCION	1
2	REVISION BIBLIOGRAFICA	4
2.1	Aguas servidas o residuales urbanas.	4
2.2	Tratamiento de aguas residuales urbanas.	5
2.2.1	Tratamiento preliminar o pretratamiento de las aguas.	6
2.2.2	Tratamiento primario o físico.	6
2.2.3	Tratamiento secundario o biológico.	6
2.2.4	Tratamiento terciario.	7
2.3	Lodos residuales.	7
2.4	Residuos lignocelulósicos.	8
2.5	Microorganismos rizados.	9
2.5.1	Hongos saprobios.	10
2.6	Propiedades bioquímicas.	11
2.6.1	Lacasa.	12
2.6.2	Manganeso peroxidasa (MnP).	12
2.7	Descripción general de la especie vegetal.	13
3	MATERIALES Y METODOS	14
3.1	Materiales.	14
3.1.1	Lugar de estudio.	14
3.1.2	Suelo.	14

3.1.3	Lodo residual.	15
3.1.4	Hongos saprobios.	15
3.1.5	Residuos lignocelulósicos.	16
3.1.6	Especie vegetal.	16
3.2	Métodos.	16
3.2.1	Propagación de plantas.	16
3.2.2	Cultivo de hongos saprobios.	16
3.2.3	Incubación de hongos saprobios a 3 tiempos.	17
3.2.4	Variables Evaluadas.	17
3.2.4.1	Peso seco aéreo y radical.	17
3.2.4.3	Actividad enzimática manganeso peroxidasa.	18
3.2.4.4	Actividad enzimática lacasa.	18
3.2.4.5	Crecimiento relativo de radícula (CRR).	19
3.2.4.6	Porcentaje de germinación relativa (PGR).	19
3.2.4.7	Análisis Estadístico.	19
3.2.5	Diseño experimental.	20
3.2.5.1	Bioensayo 1. Ensayo de germinación in-vitro.	20
3.2.5.2	Bioensayo 2. Ensayo de plantas.	21
4	RESULTADOS Y DISCUSION	22
4.1	Bioensayo 1. Germinación in-vitro de semillas de <i>E.globulus</i> , con aplicación de lodos residuales y en combinación con residuos postcosecha de trigo incubados con <i>Phanerochaete chrysosporium</i> y <i>Coriolopsis rigida</i> respectivamente.	22

4.1.1	Porcentaje de Germinación Relativa (PGR).	22
4.1.2	Crecimiento Relativo de Radícula (CRR).	26
4.2	Bioensayo 2: Desarrollo de <i>E.globulus</i> con aplicación de lodos residuales y en combinación con residuos postcosecha de trigo incubados con <i>Phanerochaete chrysosporium</i> y <i>Coriolopsis rigida</i> respectivamente.	30
4.2.1	Lodo residual no inoculado y en combinación con residuos incubados con <i>Phanerochaete chrysosporium</i> y <i>Coriolopsis rigida</i> durante cero semanas respectivamente.	31
4.2.2	Lodo residual no inoculado y en combinación con residuos incubados con <i>Phanerochaete chrysosporium</i> y <i>Coriolopsis rigida</i> durante tres semanas respectivamente.	33
4.2.3	Lodo residual no inoculado y en combinación con residuos incubados con <i>Phanerochaete chrysosporium</i> y <i>Coriolopsis rigida</i> durante seis semanas respectivamente.	35
4.2.4	Actividades enzimáticas lacasa y manganeso peroxidasa.	37
4.2.4.1	Determinación de lacasa y manganeso peroxidasa (MnP) en condiciones in-vitro.	37
4.2.4.2	Determinación de Lacasa y Manganeso peroxidasa (MnP) a nivel de suelo rizosférico.	39
5	CONCLUSIONES	43
6	RESUMEN	44
7	SUMMARY	45
8	LITERATURA CITADA	46
9	ANEXOS	52

INDICE DE CUADROS

Cuadro N°		Página
1	Composición química del suelo del Predio Rucamanque.	14
2	Elementos presentes en el lodo residual proveniente de la Planta de Tratamiento de Aguas Servidas de la comuna de Vilcún.	15

INDICE DE FIGURAS

Figura N°		Página
1	PGR de semillas de la especie <i>E.globulus</i> a 24 horas de iniciado el ensayo, bajo distintos tratamientos.	22
2	PGR de semillas de la especie <i>E.globulus</i> a 48 horas de iniciado el ensayo, bajo distintos tratamientos.	24
3	PGR de semillas de la especie <i>E.globulus</i> a 72 horas de iniciado el ensayo, bajo distintos tratamientos.	25
4	PGR de semillas de la especie <i>E.globulus</i> a 96 horas de iniciado el ensayo, bajo distintos tratamientos.	26
5	CRR de semillas de la especie <i>E.globulus</i> a 48 horas de iniciado el ensayo, bajo diferentes tratamientos.	27
6	CRR de semillas de la especie <i>E.globulus</i> a 72 horas de iniciado el ensayo, bajo diferentes tratamientos.	28
7	CRR de semillas de la especie <i>E.globulus</i> a 96 horas de iniciado el ensayo, bajo diferentes tratamientos.	29
8	Biomasa aérea y radical de <i>E.globulus</i> con aplicación de lodo residual no inoculado y en combinación con residuos postcosecha inoculados con <i>Phanerochaete chrysosporium</i> y <i>Coriolopsis rigida</i> respectivamente, al tiempo cero.	32
9	Biomasa aérea y radical de <i>E.globulus</i> con aplicación de lodo residual no inoculado y en combinación con residuos postcosecha inoculados con <i>Phanerochaete chrysosporium</i> y <i>Coriolopsis rigida</i> respectivamente, después de tres semanas de incubación.	35
10	Biomasa aérea y radical de <i>E.globulus</i> con aplicación de lodo residual no inoculado y en combinación con residuos postcosecha inoculados con <i>Phanerochaete chrysosporium</i> y <i>Coriolopsis rigida</i> respectivamente,	36

	después de seis semanas de incubación.	
11	Actividad lacasa en condiciones in-vitro de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> y <i>Coriolopsis rigida</i> .	38
12	Actividad MnP en condiciones in-vitro de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> y <i>Coriolopsis rigida</i> ..	39
13	Actividad lacasa a nivel de suelo rizosférico en los tratamientos de cada ensayo.	40
14	Actividad MnP a nivel de suelo rizosférico en los tratamientos de cada ensayo.	41

INDICE DE ANEXOS

Anexo N°		Página
1	Foto de invernadero de ambiente controlado.	52
2	Composición medios de cultivo EMA y PDA.	52-53
3	Composición medio PDB.	53
4	Foto plantas cosechadas en horno de ventilación forzada.	53
5	Fotos Bioensayo 1. Ensayo de plantas.	54

1. INTRODUCCIÓN

El mundo hoy en día se ha visto enfrentado a enormes desafíos ambientales. Estos incluyen el cambio climático, una nueva crisis mundial en la disponibilidad y contaminación del agua, pérdida de biodiversidad y daños a largo plazo a los ecosistemas, la contaminación de la atmósfera, la producción de residuos y su eliminación. Todos ellos han producido fuertes impactos, dañando los ecosistemas acuáticos, y aumentando la deforestación y degradación de la tierra.

Las aguas residuales de las ciudades son un grave problema para el medioambiente. Hoy en día la necesidad de minimizar residuos, así como su disposición adecuada y segura, son aspectos de suma importancia a nivel mundial, lo que ha llevado a la búsqueda de alternativas tecnológicas y de manejo que permitan su correcta disposición o reaprovechamiento.

Las plantas de tratamiento de aguas servidas deben tener como propósito eliminar la mayor parte de la contaminación química y bacteriológica del agua que pueda ser nociva para los seres humanos, la flora y la fauna, de manera que el agua sea dispuesta en el ambiente en forma segura.

Los lodos o fangos vienen a ser aquellos subproductos resultantes de los procesos de tratamiento de las aguas residuales. Son de gran importancia ya sea por el volumen obtenido y que se incrementa con el aumento de la población, así como por ser una fuente potencial de materia orgánica.

Los lodos, a pesar de poseer materia orgánica de alto valor nutricional para los cultivos, presentan una serie de restricciones. Dentro de los problemas que presenta el lodo para su aplicación directa sobre suelos agrícolas se encuentra su contenido de metales pesados, la presencia de organismos patógenos y compuestos orgánicos tóxicos.

Otra de las problemáticas que se derivan de la incorporación de residuos complejos al ambiente, es la eliminación de los residuos (rastros) postcosecha del trigo, debido a la contaminación atmosférica que se genera con la aplicación del método actual para limpiar las parcelas, consistente en su incineración. Es por esto, que la reutilización de los residuos del trigo resulta una alternativa positiva para el ambiente, permitiendo eliminar las quemas agrícolas.

La aplicación forestal de lodos procedentes de aguas servidas, actualmente ha revelado interesantes resultados como fuente de materia orgánica, proyectando grandes incrementos en volúmenes de madera tanto en rodales de Pino y Eucalyptus; y si, adicional a esto, se considera la combinación de éstos con residuos de postcosecha de trigo, es factible generar efectos favorables por su balance en la relación C/N. Por consiguiente se postula la siguiente hipótesis:

“La aplicación de lodos en combinación con residuos postcosecha de trigo incubados con hongos degradadores de lignina estimularán la germinación y promoverán el crecimiento de *Eucalyptus globulus*.”

Objetivo general:

Evaluar el efecto de la aplicación de residuos postcosecha de trigo (RPC) en combinación con lodos residuales (LR) incubados con hongos degradadores de lignina, sobre la germinación (in vitro) y el crecimiento inicial de *Eucalyptus globulus*.

Objetivos específicos

Evaluar el efecto de la aplicación de residuos RPC en combinación con LR incubados con dos hongos ligninolíticos, sobre el porcentaje de germinación relativa (PGR) y el

crecimiento relativo de radícula (CRR) de semillas de *E. globulus* bajo condiciones in vitro.

Evaluar la producción de biomasa aérea y radical de plantas de *E. globulus* bajo aplicación de residuos RPC en combinación con LR incubados con hongos ligninolíticos.

Determinar la biodegradación de los residuos RPC utilizados, mediante la evaluación de las actividades enzimáticas lacasa y manganeso peroxidasa bajo condiciones in vitro y a nivel de suelo rizosférico.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aguas servidas o residuales urbanas.

Estos residuos provienen de la actividad humana, especialmente las relacionadas con el uso domiciliario e industrial, que generalmente son vertidos a cursos o masas de aguas continentales o marinas. El origen de estas aguas residuales urbanas son la excretas, residuos domésticos, arrastres de lluvia, infiltraciones y residuos industriales (Seoanez, 1999).

Principalmente, los objetivos de los procesos de tratamiento de aguas residuales buscan reducir el contenido orgánico, la remoción de nutrientes y la eliminación o inactivación de organismos patógenos, que producen la contaminación de esta agua. Para esto, se deben llevar a cabo diferentes métodos individuales que se pueden combinar, para dar lugar a diversos niveles de tratamiento de las aguas residuales (Alcota, 2002).

La purificación de las aguas residuales implica la separación de las sustancias contaminantes, obteniéndose un efluente líquido y una fracción de sólidos. Esta separación no es completa: por una parte la fracción de agua mantiene ciertos niveles de sólidos suspendidos y sustancias disueltas, mientras que los lodos se caracterizan por un contenido elevado de agua (Cortez, 2003).

2.2. Tratamiento de aguas residuales urbanas.

Los métodos individuales de tratamiento de aguas residuales se suelen clasificar en operaciones físicas, procesos químicos y procesos biológicos, todos unitarios, en los cuales la eliminación o conversión de los contaminantes es provocado por aplicaciones de fuerzas físicas, adición de productos químicos o actividad biológica, respectivamente (Metcalf y Eddy, 1998; Orrego 2007).

El tratamiento de las aguas residuales urbanas (figura 1), es un proceso que se clasifica en:

- Tratamiento Preliminar o pre tratamiento.
- Tratamiento Primario.
- Tratamiento Secundario o Biológico.
- Tratamiento Terciario.

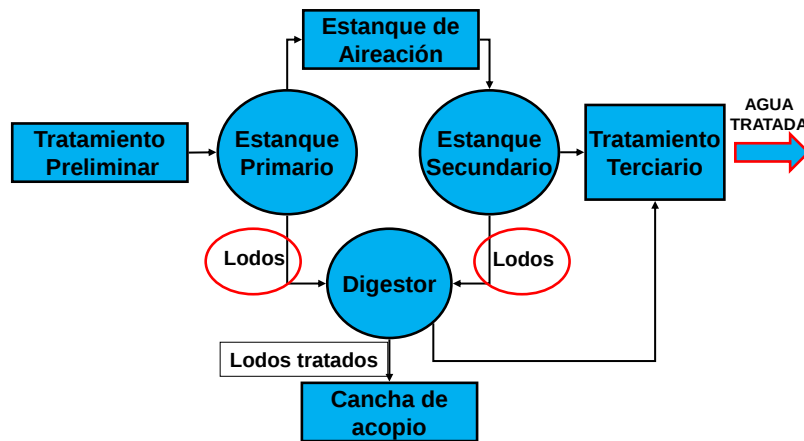


Figura 1. Procesos de tratamiento de aguas servidas.

Tratamiento primario de aguas servidas, es el proceso que se emplea para eliminar los sólidos de las aguas contaminadas; secundario, con el que se logra reducir la cantidad de MO por acción de bacterias que disminuyen la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), y terciario, al proceso que se usa para eliminar los productos químicos como fosfatos, nitratos, plaguicidas, sales, MO persistente, entre otros (Sánchez, 2005).

2.2.1. Tratamiento preliminar o pretratamiento de las aguas.

Dentro de las unidades que componen este tratamiento se puede nombrar el desbaste para eliminar sólidos gruesos y sedimentables por intercepción; la flotación para eliminar sólidos en suspensión finamente divididos y de partículas con densidades cercanas al agua (grasas y aceites); y el desarenado para eliminar materia en suspensión gruesa (Toro, 2005). En Chile, el 64% de las PTAS tienen algún tipo de tratamiento preliminar, siendo las rejas el más común (Baraño y Tapia, 2004).

2.2.2. Tratamiento primario o físico.

El tratamiento primario de las aguas servidas es un proceso mecánico que utiliza cribas o filtros para separar los desechos de mayor tamaño como palos, piedras y trapos que puedan entorpecer este proceso. Las aguas del alcantarillado llegan a la cámara de dispersión donde se encuentran las cribas, de donde pasan las aguas al tanque de sedimentación. De aquí los sedimentos circulan hacia un tanque digestor y luego al lecho secador. Desde el tanque de sedimentación, el agua es conducida por tuberías hacia un sistema de desinfección UV o a desinfección con cloro para eliminar las bacterias, y una vez que cumple con los límites de depuración es arrojada a un lago, un río o al mar (Rivas, 2005).

2.2.3. Tratamiento secundario o biológico.

Corresponde a un tratamiento biológico, cuyo principal objetivo es el de coagular y eliminar sustancias sólidas coloides no sedimentables y la estabilización de la materia orgánica. De esta manera se eliminan todas aquellas sustancias orgánicas disueltas o sólidos que no han sido eliminados en la etapa anterior de tratamiento primario o físico (Rivas 2005).

2.2.4. Tratamiento terciario.

Este tratamiento consiste en un proceso físico-químico que tiene como objeto la eliminación de contaminantes que no han sido desechados en los tratamientos primarios y secundarios de los procesos convencionales (Bustamante, 1999). Esta etapa consiste en la eliminación selectiva de microorganismos, mediante diferentes formas de desinfección como: cloro, dióxido de cloro, ozono, luz ultravioleta, entre otras (Rodríguez, 2007).

2.3. Lodos residuales.

Las plantas de tratamiento de aguas residuales producen biosólidos, que corresponden a lodos que contienen gran cantidad de materia orgánica, microorganismos, macro y micro nutrientes, metales pesados y agua. Según la Comisión Nacional del Medio Ambiente, los lodos cloacales se definen como acumulaciones de sólidos orgánicos sedimentables, separados en los distintos procesos de tratamiento de aguas (CONAMA, 1999).

Pomares (2001) señala que los posibles sistemas de eliminación de estos residuos orgánicos, como el depósito en vertederos o la incineración, además de provocar una alta contaminación ambiental, desaprovechan los recursos contenidos en estos residuos, y sostiene que la opción más interesante sería la utilización agraria con sus diversas variantes (agrícola, forestal, jardinería, repoblación de suelos degradados, entre otros), ya que permite el reciclado de parte de los nutrientes extraídos del suelo por las cosechas, y simultáneamente reduce el déficit de MO existente en los suelos agrícolas de las regiones áridas o semiáridas.

Los lodos provenientes de las plantas de tratamiento de aguas servidas, cuando son incorporados al suelo en dosis adecuadas, provocan una mejora en las características físicas del suelo como la disminución de la densidad aparente, un aumento en la

porosidad, mayor estabilidad de los agregados y capacidad de retención de agua, además de un incremento en la tasa de infiltración del agua. Estos efectos de los lodos sobre las características físicas se traducirían en una mejor exploración del suelo por el sistema radical, mayor facilidad para el cultivo, mejor suministro de agua y oxígeno para las plantas, así como una mayor resistencia del suelo a la erosión (Pomares, 2001; Ojeda *et al.*, 2003).

Chile cuenta con un reglamento que tiene por objeto regular el manejo sanitario de los lodos no peligrosos provenientes de plantas de tratamiento de aguas. Con ello se protege la salud de la población y previene el deterioro de los recursos naturales, aire, agua, flora, fauna y suelo (CONAMA, 2001). El Título II del Reglamento sobre Manejo de lodos no peligrosos generados en Plantas de Tratamiento de Aguas, está dirigido a la utilización de Lodos en la Agricultura, considerando las actividades de siembra, plantación y cosecha.

2.4. Residuos lignocelulósicos.

La lignocelulosa es el mayor componente de la biomasa, comprende aproximadamente la mitad de la materia vegetal producida por la fotosíntesis y representa el más abundante de los recursos orgánicos renovables en el suelo. Consta de tres tipos de polímeros, celulosa, hemicelulosa y lignina que están fuertemente entrelazados y unidos químicamente por fuerzas no-covalentes y enlaces covalentes cruzados (Sánchez, 2009).

Los residuos lignocelulósicos de la madera, hierba, residuos agrícolas, forestales y de residuos sólidos urbanos son particularmente abundantes en la naturaleza y tienen un potencial de bioconversión. Ellos constituyen un recurso renovable a partir del cual se pueden derivar muchos productos biológicos y químicos útiles. La acumulación de lignocelulosa en grandes cantidades en lugares donde los residuos agrícolas presentan un

problema de eliminación, da como resultado no sólo el deterioro del medio ambiente, sino también la pérdida de material potencialmente valioso, que puede ser utilizado en la fabricación de papel, la producción de combustible de biomasa, el compostaje, la alimentación humana y animal entre otros. Recientemente se han identificado varios mercados novedosos para residuos lignocelulósicos. El uso de hongos en proyectos de biorremediación de bajo costo puede ser atractivo debido a su sistema enzimático de hidrólisis lignocelulósica (Sánchez, 2009).

2.5. Microorganismos rizosféricos.

El suelo contiene gran población de bacterias, actinomicetes, algas, hongos, protozoos y virus. Es uno de los lugares donde las interacciones biológicas son más intensas, y donde ocurren los procesos bioquímicos vinculados a la degradación de la materia orgánica y las transformaciones de elementos minerales muy importantes para la nutrición de las plantas (Frioni, 1990).

Los microorganismos del suelo son importantes en la recuperación de ambientes desequilibrados y potencialmente tóxicos, porque producen sustancias estimulantes para el crecimiento de las plantas como las hormonas y vitaminas, se unen a las partículas del suelo en agregados estables que mejoran la estructura del suelo, reducen el riesgo de erosión y pueden contribuir a la disponibilidad de nutrientes para las plantas (Arriagada *et al.*, 2009).

Los microorganismos, como bacterias y hongos, representan componentes esenciales del sistema suelo (Hackl *et al.*, 2005). Son claves para la descomposición de la materia orgánica, fundamentales para el ciclo de C y N y un indicador sensible de los cambios en el total de la materia orgánica (Beare *et al.*, 1992).

2.5.1. Hongos saprobios.

Uno de los organismos que se encuentran presentes en el suelo son los hongos saprobios, los cuales viven sobre materia orgánica en descomposición, es decir sobre materia muerta (restos orgánicos de la descomposición de plantas y animales que contiene el suelo, partes muertas de la madera de árboles, excrementos de animales, entre otros). Es relevante el uso de estos hongos en la actualidad principalmente por su capacidad para descontaminar sitios con presencia de sustancias tóxicas o de muy difícil degradación (Van Beek *et al.*, 2006), por lo que representan una gran alternativa en procesos de biorremediación.

Según Arriagada (2001), Baldrian (2002) y Bayramoglu *et al.*, (2003) diversas especies de hongos saprobios son capaces de absorber y retener en sus paredes celulares algunos metales pesados como Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn.

El rol básico de estos hongos consiste en la descomposición y mineralización de aquellos residuos orgánicos incorporados al suelo, liberando mediante su metabolismo gran cantidad de enzimas capaces de destruir compuestos de estructuras complejas, obteniendo de esta manera su fuente energética y alimenticia (Acuña *et al.*, 2006). También, pueden producir grandes cantidades de enzimas hidrolíticas capaces de digerir la celulosa y usarla como fuente de carbono (Mendgen y Deising, 1993). Es así, como estos hongos pueden ser utilizados como transformadores de residuos agroindustriales o material lignocelulósico, debido a que son capaces de degradar lignina y celulosa, así como sustancias tóxicas, incluidas las fenólicas (Madrid *et al.*, 1996).

Los hongos de pudrición blanca pertenecientes al género *Coriulopsis* se han utilizado para descontaminar los efluentes de metales, a partir de residuos agroindustriales. Estos hongos saprobios son capaces de eliminar metales pesados como el cobre, mediante la adsorción de ellos en su micelio. El grado de acumulación y la tolerancia de cobre del

suelo difieren en diferentes especies de estos hongos. Es sabido que los hongos de pudrición blanca aumentan el crecimiento de las plantas, especialmente cuando se cultivan en suelos contaminados con desechos agroindustriales (Arriagada *et al.*, 2009).

Otro de los miembros de este grupo es *Phanerochaete chrysosporium*, hongo de la pudrición blanca de la madera, capaz de degradar completamente los principales componentes de paredes celulares vegetales incluyendo celulosa, hemicelulosa y lignina (Tevere *et al.*, 2005). Los hongos de la pudrición blanca como *Phanerochaete chrysosporium* son capaces de degradar una amplia variedad de compuestos aromáticos a través de enzimas, entre las cuales se han reportado las ligninolíticas, como por ejemplo la lignina peroxidasa (LiP) y la manganeso peroxidasa MnP. Se ha propuesto a este hongo en programas de biorremediación para los efluentes provenientes de la industria textil (Asamudo *et al.*, 2005).

2.6. Propiedades bioquímicas.

Una de las propiedades más interesantes de los hongos de la pudrición blanca es el estudio de sus actividades enzimáticas extracelulares. Estas actividades enzimáticas han sido estudiadas, tanto como mecanismos de protección de la planta al ser producidas por las raíces de las plantas contra estrés abióticos como lo son los metales pesados, sequías y temperaturas extremas; como para el uso de hongos de pudrición blanca y degradadores del litter en procesos de decoloración de colorantes sintéticos y biotransformación de compuestos clorofenólicos en sustancias húmicas aprovechables por los microorganismos del suelo, por enzimas extracelulares como manganeso peroxidasa, lacasa y lignina peroxidasa (Baldrian y Snajdr, 2006; San Martín, 2007).

2.6.1. Lacasa.

La enzima Lacasa es capaz de degradar diversos compuestos orgánicos tóxicos y altamente mutagénicos como los PHAs (hidrocarburos policíclicos aromáticos con 4 o más anillos) pero requiere intervalos de pH específicos para degradar estos compuestos, como por ejemplo el fluoreno, pireno, antraceno, peryleno, fluoranteno y phenantreno, al usar diversos mediadores como ABTS, Siringaldazina, DMOP y Cathecol (Pozdnyakova *et al.*, 2006).

Esta enzima esta distribuida en plantas superiores y hongos, especialmente en los de pudrición blanca de la madera. Las temperaturas óptimas de producción de esta enzima se encuentran en un rango de 15°C a 25°C, debido a que a mayores temperaturas ésta decrece (Rodakiewicz-Nowak, 2000).

2.6.2. Manganese peroxidasa (MnP).

La MnP es una de las principales oxidoreductasas involucradas en la degradación de la lignina. Corresponde a una enzima extracelular producida por casi todos los hongos colonizadores de la madera causantes de la pudrición blanca y últimamente se ha incorporado los descomponedores del litter (Gonzáles, 2008).

Lo más relevante de esta enzima, es lo poco específica o versátil que resulta ser, lo que le permite no sólo oxidar la lignina, sino también otros materiales recalcitrantes como sustancias húmicas, carbonatadas, entre otras. Estas capacidades hacen de la enzima MnP un promisorio biocatalizador para aplicaciones biotecnológicas (San Martín, 2007).

Otro elemento relevante de esta enzima es su potencial actuación en suelos provenientes de bosques con buenos niveles de materia orgánica. Se ha experimentado con diversos solventes orgánicos que favorecen la oxidación de compuestos fenólicos (Rodakiewicz-

Nowak *et al.*, 2006). De ahí la probable importancia de adecuados contenidos orgánicos en el actuar de esta enzima (San Martín, 2007).

2.7. Descripción general de *E. globulus*.

El género *Eucalyptus* corresponde botánicamente a la clase Angiosperma, Subclase Dicotiledoneae y a la familia Mirtaceae. Existen en el género más de 500 especies originarias de Australia y algunas islas cercanas (Strasburger *et al.*, 1994).

Estos árboles pueden alcanzar hasta 60 metros de altura, tienen la corteza blanquecina, que se desprende fácilmente en tiras en los ejemplares adultos. Sus frutos son como una cápsula campaniforme de color blanco, cubierta de un polvo blanquecino, de 1,4 a 2,4 cm de diámetro. Se multiplica por semillas, es algo sensible a las sequías prolongadas y prefiere suelos ligeramente ácidos y frescos. Este árbol es también medicinal, ya que sus hojas contienen aceites que al ser destilados se destinan a las industrias químico-farmacéuticas y de confitería. En medicina popular se utilizan sus hojas en infusiones y vapores (González-Río *et al.*, 1997).

La importancia de *E. globulus* se fundamenta en la calidad de la madera y fibras de esta especie, lo que unido a las características de crecimiento y adaptación, le confieren un conjunto de propiedades muy favorables tanto para la silvicultura como para las aplicaciones industriales (San Martín, 2007).

El eucalipto es una especie arbórea con una gran plasticidad para crecer en suelos pobres o marginales y es capaz de acumular grandes cantidades de metales pesados (Arriagada *et al.*, 2009). El género *Eucalyptus* posee una gran tolerancia para crecer en suelos contaminados con metales pesados, además se caracteriza por ser una especie hiperacumuladora de éstos. Es por esto que resulta ser una de las especies más idóneas para utilizar en programas de fitorremediación (Arriagada, 2001).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Lugar de estudio.

Todas las actividades que se debieron realizar para la elaboración de este estudio fueron desarrolladas en el Laboratorio de Biorremediación y en el invernadero de ambiente controlado (Anexo 1), de la Universidad De La Frontera.

3.1.2. Suelo.

El suelo utilizado fue un Andisol (Serie ñielol) proveniente del predio Rucamanque (Universidad de La Frontera, Temuco).

Cuadro 1 Composición química del suelo del Predio Rucamanque.

Componente	Valor
Profundidad de la muestra (cm)	0-20
pH	5,47
MO (%)	24,4
C (%)	14,38
N (mg/Kg)	24,8
P total (mg/Kg)	1480
P Olsen (mg/Kg)	8,6
K (mg/Kg)	421
Al (mg/Kg)	1778,7
Fe (mg/Kg)	47,2

Fuente: Determinación analítica en Depto. de Ciencias Químicas, Universidad de la Frontera.

3.1.3. Lodo residual. (LR)

El lodo utilizado en este estudio fue obtenido de la planta de tratamiento de aguas servidas de la comuna de Vilcún, dependiente de Aguas Araucanía S.A.

Cuadro2. Elementos presentes en el lodo residual proveniente de la Planta de Tratamiento de Aguas Servidas de la comuna de Vilcún.

Componente	Unidad	Valor
P disponible	ppm	1298
K disponible	ppm	3101
S disponible	ppm	370,04
N (Kjeldhal)	g/Kg	39,4
Suma de bases	meq/100g	95,19
Saturación de Al	%	0,02
Al extractable	ppm	90
Fe	mg/Kg	298,3
Cu	mg/Kg	749,2
Zn	mg/Kg	838,5
Cd	mg/Kg	2,91
Pb	mg/Kg	61,3
Ni	mg/Kg	28,7
Hg	mg/Kg	1,04
As	mg/Kg	9,86
M. O	%	53,4

Fuente: Determinación analítica en Laboratorio de Suelos, Universidad de La Frontera (2007).

3.1.4. Hongos saprobios.

Se utilizaron los hongos saprobios *Phanerochaete chrysosporium* (P.c) y *Coriolopsis rigida* (C.r). Estas especies pertenecen a la colección fúngica del laboratorio de Biorremediación de la Universidad de La Frontera.

3.1.5. Residuos lignocelulósicos. (RPC)

Los residuos lignocelulósicos postcosecha de trigo utilizados en este estudio fueron provenientes de la estación experimental Maquehue de la Universidad de La Frontera; el cual fue un cultivo comercial de trigo, que fue cosechado durante la temporada estival.

3.1.6. Especie vegetal.

Se utilizaron plantas de la especie *Eucalyptus globulus* Labill, procedentes del programa de mejoramiento de semillas de la empresa Forestal Monte Águila (Los Angeles, Región del Bio-Bio).

3.2. Métodos

3.2.1. Propagación de plantas.

Las semillas de *E. globulus* fueron desinfectadas en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5 % durante 20 minutos, lavadas con abundante agua destilada y dejadas en imbibición durante 24 horas. Posteriormente, fueron sembradas en bandejas plásticas con capacidad para 200 plántulas usando una mezcla de suelo: arena en proporción 4:1 (v:v), y regadas con agua cada 48 horas. Las plantas de *E. globulus* obtenidas se establecieron en macetas de 125 cm³, completados con una mezcla estéril de suelo: arena 4:1 (v:v).

3.2.2. Cultivo de hongos saprobios.

Los hongos fueron inoculados en placas petri, en presencia de un medio de cultivo sólido agar extracto de malta (EMA) y agar papa dextrosa (PDA) (Anexo 2), y fueron incubados a 24 °C durante una semana, con la finalidad de colonizar la placa. Todo este

procedimiento se realizó bajo cámara de flujo laminar con el fin de minimizar los riesgos de contaminación tanto en el medio de cultivo, como en las placas que contienen los hongos utilizados.

Los hongos previamente multiplicados en placas petri, fueron inoculados en un medio de cultivo líquido denominado caldo de papa dextrosa (PDB) (Anexo 3), y llevados a agitación en un shaker durante 15 días a 150 rpm y 27°C (Para efectos de ensayo).

3.2.3. Incubación de hongos saprobios a 3 tiempos.

Una vez que los hongos fueron incubados en el medio de cultivo, se aplicó a cada matraz una mezcla de 45 g de LR, 15 g de residuo RPC y 45 ml de medio de cultivo que contiene micelio de hongo *Coriolopsis rigida* y *Phanerochaete chrysosporium*, respectivamente. Cada matraz preparado contenía mezcla suficiente para 3 macetas.

Se prepararon 2 matraces por cada hongo, para cada tiempo de incubación, dejándolos en incubadora (24°C) durante 0 - 3 y 6 semanas.

3.2.4. Variables Evaluadas.

3.2.4.1. Peso seco aéreo y radical.

Una vez que las plantas fueron cosechadas, se separó la parte aérea de la radical y fueron secadas en un horno de ventilación forzada (Anexo 4), a 70°C durante 48 horas. Luego de esto fueron pesadas en una balanza digital.

3.2.4.2. Actividad enzimática manganeso peroxidasa.

Para la cuantificación de esta enzima se utilizó la metodología descrita por Paszcynki *et al.*, (1998), donde la oxidación del Mn (II) a Mn (III) es la que se mide a una longitud de onda de 238 nm.

En cada tubo de ensayo se agregó 1gr de muestra, 2 ml de tartrato de sodio 0,1M pH 5, 2 ml de H₂O₂ 0,1 mM y 2 ml de MnSO₄ 0,1 mM. Los tubos se colocaron en una gradilla para posteriormente ser llevados a un baño termoregulado a 25°C por 30 minutos. Luego se extrajo 2 ml de cada muestra y se depositaron en las respectivas cubetas. Finalmente se midió en espectrofotómetro a una absorbancia de 238 nm, contra un blanco al cual se le incorporó sólo agua destilada.

3.2.4.3. Actividad enzimática lacasa.

Se determinó mediante el método de monitoreo de la oxidación de ABTS (2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) de acuerdo al método de Bourbonnais y Paice (1990).

Para el blanco, se utilizó un tubo eppendorf al cual se le añadió 1,1 ml de agua desionizada, 0,3 ml de acetato de sodio 50 mM pH 5 y 0,1 ml de ABTS 2 mM. Para cada muestra, a tubos de ensayo de 15 ml se les añadió 3gr de muestra, 0,9 ml de acetato de sodio 50 mM, 0,3 ml de ABTS 2 mM y 0,3 ml de agua desionizada. El blanco y las muestras se colocaron en una gradilla, la que fue llevada a un shaker a 120 rpm durante 13 minutos. Luego, la gradilla con los tubos se dejó en un baño termoregulado a 25°C por otros 13 minutos. Por ultimo se extrajo todo el contenido de los tubos con una micropipeta y se depositó en las respectivas cubetas. Finalmente se midió en espectrofotómetro a 420 nm, contra el blanco.

3.2.4.4. Crecimiento relativo de radícula (CRR).

Se evaluó según la siguiente fórmula descrita por Tiquia (2000):

$$\text{CRR} = \frac{\text{Elongación de radículas en el extracto}}{\text{Elongación de radículas en el testigo}} \times 100$$

3.2.4.5. Porcentaje de germinación relativa (PGR).

Se evaluó según la siguiente fórmula descrita por Tiquia (2000):

$$\text{PGR} = \frac{\text{Nº de semillas germinadas en el extracto}}{\text{Nº de semillas germinadas en el testigo}} \times 100$$

3.2.4.6. Análisis Estadístico.

Los resultados arrojados en los diferentes ensayos se sometieron a un análisis de normalidad y homogeneidad de varianzas, y luego se efectuó un análisis de varianza (ANOVA), comparándose las medias mediante el test de Duncan.

Para este análisis se utilizó el software SPSS 11.5. La significancia estadística fue establecida a $P < 0,05$. Los datos de porcentaje fueron transformados de forma previa a los análisis de normalidad.

3.2.5. Diseño experimental.

Los Bioensayos efectuados en este trabajo se desarrollaron según los siguientes diseños:

3.2.5.1. Bioensayo 1. Ensayo de germinación *in-vitro*.

Se establecieron 3 placas petri con 10 semillas de *E. globulus*, por cada placa que contenía 20 ml de un medio agar-agua (15g l⁻¹), para cada uno de los tratamientos que se mencionan a continuación:

- a) Tratamiento control, solo con la semilla.
- b) Tratamiento LR: 22,5 ml de LR sin incubar 100 ml.
- c) Tratamiento RPC: 5 g de residuo RPC 100 ml.
- d) Tratamiento Mezcla: 22,5 ml de LR 100 ml + 5 g de residuo RPC 100 ml.
- e) Tratamiento RPC+LR+C.r: 22,5 ml de LR 100 ml + 5 g de residuo RPC 100 ml + 15 ml 100 ml de medio de cultivo que contiene micelio de hongo *Corioloopsis rigida*.
- f) Tratamiento RPC+LR+P.c: 22,5 ml de LR + 5 gr de residuo RPC 100 ml + 15 ml 100 ml de medio de cultivo que contiene micelio de hongo *Phanerochaete chrysosporium*.

Finalmente, las placas fueron puestas en cámara de germinación a 24°C y se evaluó a las 24, 48, 72 y 96 horas el crecimiento relativo de radícula (CRR) y el porcentaje de germinación relativa (PGR), no incluyendo dentro de lo publicado los valores del tratamiento control, sin embargo se comentan de manera referencial y para obtener comparaciones.

3.2.5.2. Bioensayo 2. Ensayo de plantas.

Las plantas de *E. globulus* fueron sometidas a los siguientes tratamientos:

- a) Tratamiento control, solo con la planta.
- b) Tratamiento LR: 15 g de LR sin incubar aplicado directamente a la maceta.
- c) Tratamiento RPC+LR+P.c incubado a 3 tiempos: 20 g del hongo incubado.
- d) Tratamiento RPC+LR+C.r incubado a 3 tiempos: 20 g del hongo incubado.

Los tratamientos fueron aplicados a cada maceta que contenía aproximadamente 200 gr de suelo (Anexo 5). Se utilizaron 6 repeticiones por tratamiento. El ensayo se repitió para cada tiempo de incubación de los hongos (semana 0-3-6), siendo evaluadas a la cuarta semana de establecido cada ensayo.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. Bioensayo 1: Germinación in-vitro de semillas de *E. globulus*, con aplicación de lodos residuales y en combinación con residuos de postcosecha de trigo incubados con *Phanerochaete chrysosporium* y *Coriolopsis rigida* respectivamente.

4.1.1. Porcentaje de Germinación Relativa (PGR).

A 24 horas de iniciado el ensayo, el tratamiento Mezcla, presenta la mejor respuesta germinativa, en comparación a los diferentes tratamientos, con un PGR de 156 %.

De acuerdo con la figura 2, los tratamientos RPC y RPC+LR+C.r, no muestran diferencias significativas entre sí, obteniendo un PGR igual al tratamiento Control.

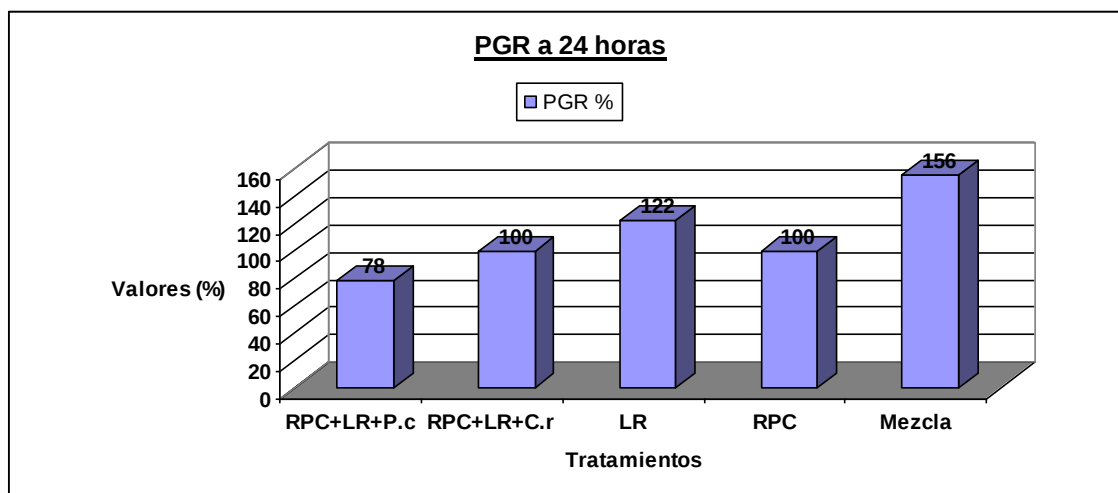


Figura 2. Porcentaje de germinación relativa (PGR) de semillas de la especie *E. globulus* a 24 horas de iniciado el ensayo, bajo los tratamientos: LR= lodo residual; RPC= residuos postcosecha; MEZCLA= residuos postcosecha + lodo residual; RPC+LR+P.c= lodo residual + residuos postcosecha + *P. chrysosporium*; RPC+LR+C.r= lodo residual + residuos postcosecha + *C. rigida*.

Al comparar los tratamientos Mezcla y RPC+LR+P.c, se pudieron apreciar amplias diferencias, donde el primero (156 %) dobló el porcentaje germinativo de este último tratamiento (78%) (Figura 2).

Se puede observar en la Figura 2, que el tratamiento RPC+LR+P.c presentó los más bajos índices de germinación, incluso más bajos que el tratamiento Control, esto puede pasar al existir un exceso en la concentración de compuestos orgánicos tóxicos, lo que provocaría un efecto adverso en el desarrollo del hongo y sus enzimas. Situación similar obtuvieron Aranda., *et al* (2007), quienes observaron una disminución de la fitotoxicidad de residuos procedentes del olivar, solo hasta ciertas concentraciones. Además pudo ocurrir que en los ensayos el lodo residual no favoreciera el crecimiento del hongo saprobio, impidiendo un desarrollo homogéneo y armónico, debido a la presencia de compuestos potencialmente tóxicos (Arriagada, 2001).

A 48 de iniciado el ensayo, como muestra la Figura 3, la variable PGR generó los mayores índices de germinación con el tratamiento RPC+LR+C.r (118 %). Esta situación se asemeja a lo planteado por Aranda *et al.*, (2006), quienes probaron la efectividad de *C. rigida* y otros hongos saprobios sobre extractos de residuo agroindustrial, los cuales eliminaron totalmente la fitotoxicidad sobre la germinación de semillas de *Lepidium sativum*, disminuyendo el contenido total de fenoles del residuo. Además, el hongo incubado tiene la capacidad de inmovilizar compuestos negativos existentes en el lodo, que junto con la inoculación, otorga un mayor traslado de elementos nutritivos a la planta, favoreciendo su crecimiento y desarrollo.

Las semillas tratadas con RPC y RPC+LR+P.c mostraron porcentajes de germinación menores que el tratamiento Control, con valores de 95 % y 86 % respectivamente.

El tratamiento Mezcla y LR, ambos con PGR 105 %, mostraron un efecto positivo en la germinación de semillas, situación similar a lo percibido en la medición anterior (24 horas).

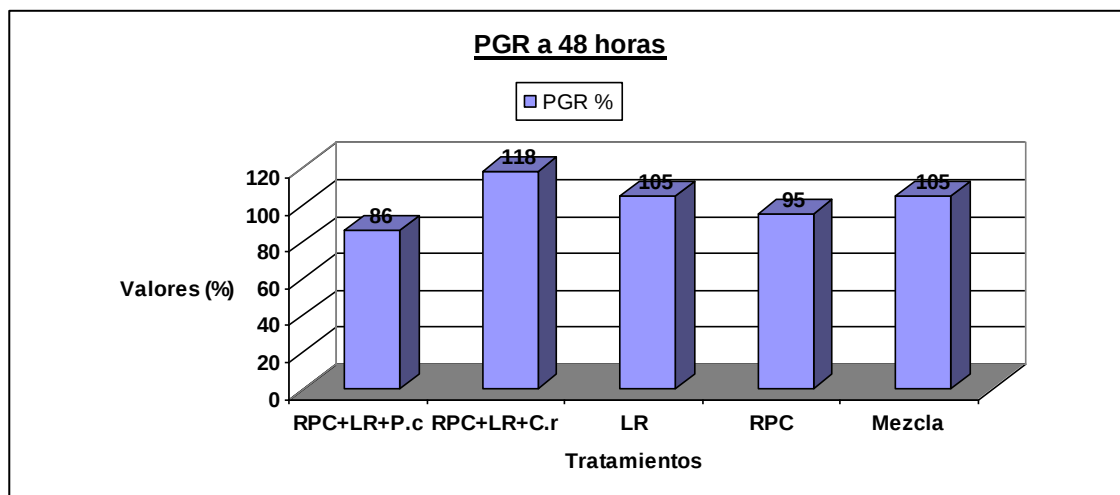


Figura 3. Porcentaje de germinación relativa (PGR) de semillas de la especie *E. globulus* a 48 horas de iniciado el ensayo, bajo los tratamientos: LR= lodo residual; RPC= residuos postcosecha; MEZCLA= residuos postcosecha + lodo residual; RPC+LR+P.c= lodo residual + residuos postcosecha + *P. chrysosporium*; RPC+LR+C.r= lodo residual + residuos postcosecha + *C. rigida*.

En la Figura 4 se muestra que todos los tratamientos evaluados presentaron valores PGR superior al tratamiento Control (datos no incluidos), donde el tratamiento RPC arrojó inferiores incrementos en la germinación de semillas, aunque igualmente mayores que el tratamiento Control (104 %).

Se obtuvieron resultados sobresalientes con los tratamientos Mezcla y RPC+LR+C.r, ambos con PGR 116 %. La producción de fitohormonas, es probable que juegue un papel importante al ser inoculados los hongos saprobios al sustrato, en conjunto con su poder degradador de sustancias tóxicas (Madrid *et al.*, 1996).

Con un valor de PGR 112 %, resultados igualmente benéficos en la germinación se lograron con el tratamiento LR, escenario que se repitió durante el transcurso de las mediciones anteriores.

Según se observa en la Figura 4, el tratamiento RPC+LR+P.c, obtuvo un PGR 108 %, contribuyendo positivamente en la germinación de semillas de *E. globulus*, situación que mejoró con respecto a la medición anterior (48 horas), en la cual no superó los resultados del tratamiento Control.

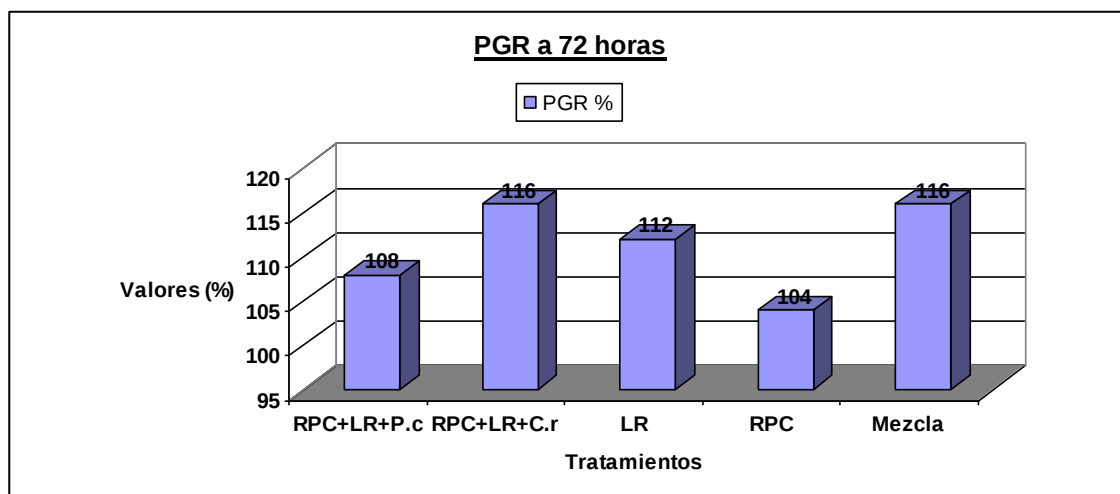


Figura 4. Porcentaje de germinación relativa (PGR) de semillas de la especie *E. globulus* a 72 horas de iniciado el ensayo, bajo los tratamientos: LR= lodo residual; RPC= residuos postcosecha; MEZCLA= residuos postcosecha + lodo residual; RPC+LR+P.c= lodo residual + residuos postcosecha + *P. chrysosporium*; RPC+LR+C.r= lodo residual + residuos postcosecha + *C. rigida*.

La Figura 5 muestra el porcentaje de germinación relativa a 96 horas de iniciado el ensayo, es decir, al momento de la última medición. Los tratamientos Mezcla y RPC+LR+C.r continuaron generando efectos positivos en la germinación, al igual que el registro del ensayo a las 72 horas, y fueron semejantes a los resultados proporcionados por el tratamiento LR (PGR 112 %). El tratamiento PGR+LR+P.c, igualmente estimula resultados favorables en las semillas (PGR 104 %).

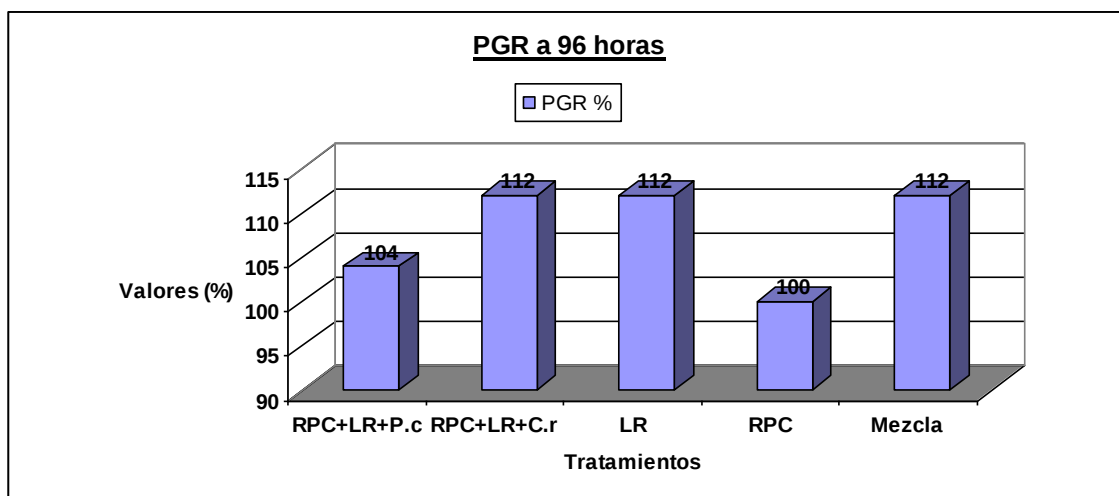


Figura 5. Porcentaje de germinación relativa (PGR) de semillas de la especie *E. globulus* a 96 horas de iniciado el ensayo, bajo los tratamientos: LR= lodo residual; RPC= residuos postcosecha; MEZCLA= residuos postcosecha + lodo residual; RPC+LR+P.c= lodo residual + residuos postcosecha + *P. chrysosporium*; RPC+LR+C.r= lodo residual + residuos postcosecha + *C. rigida*.

4.1.2. Crecimiento Relativo de Radícula (CRR).

Al momento de la primera medición, a 24 horas de iniciado el ensayo, no se presentaron crecimientos de radícula que se lograran medir, en ninguno de los tratamientos realizados, por lo que no se consideró, empezando a las 48 horas la primera medición de resultados.

En forma general, ninguno de los tratamientos medidos, a 48, 72 y 96 horas de iniciado el ensayo, logró superar en CRR al tratamiento Control, siendo el tratamiento LR medido a las 96 horas, el que proporcionó resultados más cercanos, alcanzando un CRR de 97 %, observando de esta manera una evidente tendencia al descenso en el crecimiento radicular con los tratamientos aplicados.

En la Figura 6, a 48 horas de iniciado el ensayo, se observó que ningún tratamiento superó el nivel de respuesta germinativa del tratamiento Control. Se evidenció claramente una disminución en el crecimiento de radícula en los tratamientos

RPC+LR+C.r (56 %) y RPC+LR+P.c (59 %), a pesar de que en forma general los hongos saprobios generaran sustancias estimulantes para las plantas denominadas fitohormonas, que provocarían un aumento sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas (Madrid *et al.*, 1996; Mc Allister *et al.*, 1996; Arriagada *et al.*, 2005).

El tratamiento con lodo residual proyectó según la Figura 6, una disminución en el incremento de radícula, con un valor de 67 % con respecto al tratamiento Control, lo que podría relacionarse con lo descrito por Varnero *et al.*, (2007), que señala que la baja respuesta en el crecimiento de radícula esta relacionada con la presencia de metabolitos moderadamente fitotóxicos, incapaces de impedir la germinación de las semillas, pero pueden limitar el desarrollo de la radícula. Sin embargo es preciso señalar que en Chile los lodos provenientes de las PTAS presentan niveles muy bajos de metales pesados y gran concentración de micro y macronutrientes en comparación a países industrializados (Leppe, 2007).

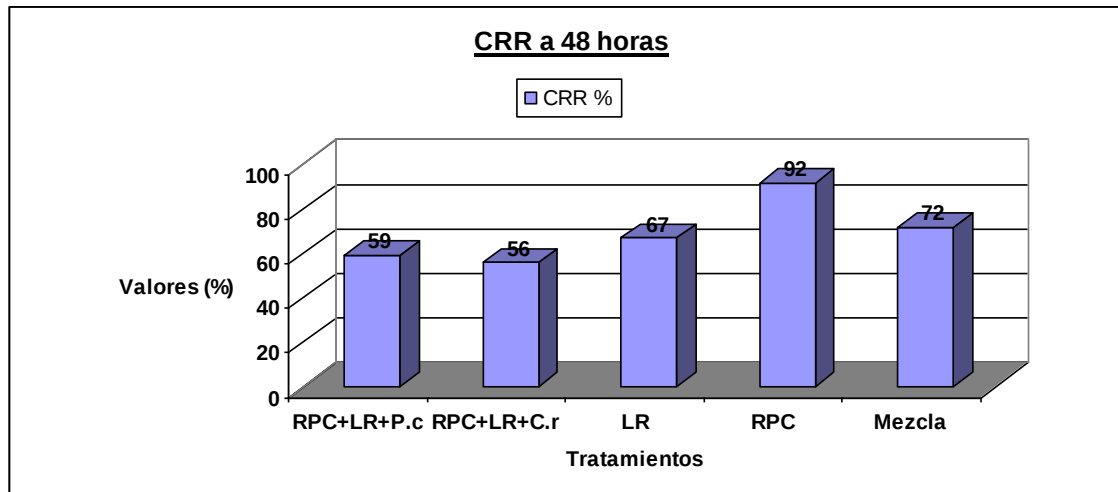


Figura 6. Crecimiento relativo de radícula (CRR) de semillas de la especie *E. globulus* a 48 horas de iniciado el ensayo, bajo los tratamientos: LR= lodo residual; RPC= residuos postcosecha; MEZCLA= residuos postcosecha + lodo residual; RPC+LR+P.c= lodo residual + residuos postcosecha + *P. chrysosporium*; RPC+LR+C.r= lodo residual + residuos postcosecha + *C. rigida*.

La Figura 7 muestra que se repite la tendencia demostrada en la Figura 6, donde el tratamiento Control sigue obteniendo una mejor respuesta en relación a los tratamientos restantes. Se revelo que, a continuación de los resultados del tratamiento Control, los más sobresalientes en crecimiento relativo de radícula los generó el tratamiento LR (CRR 80 %), superando ampliamente a los demás tratamientos.

Al considerar el tratamiento residuo RPC, como muestra la Figura 7, los resultados arrojados fueron los mas desfavorables, manifestando un valor de CRR 44 % en comparación con el tratamiento Control.

El tratamiento Mezcla (CRR 59 %) fue en disminución al comparar los resultados con los valores de la medición anterior (CRR 72%), efectuada a las 48 horas.

De forma similar a lo acontecido a las 48 horas, los tratamientos RPC+LR+C.r y RPC+LR+P.c se mantuvieron entre 50 % y 60 %, resultados desfavorables con respecto al tratamiento Control.

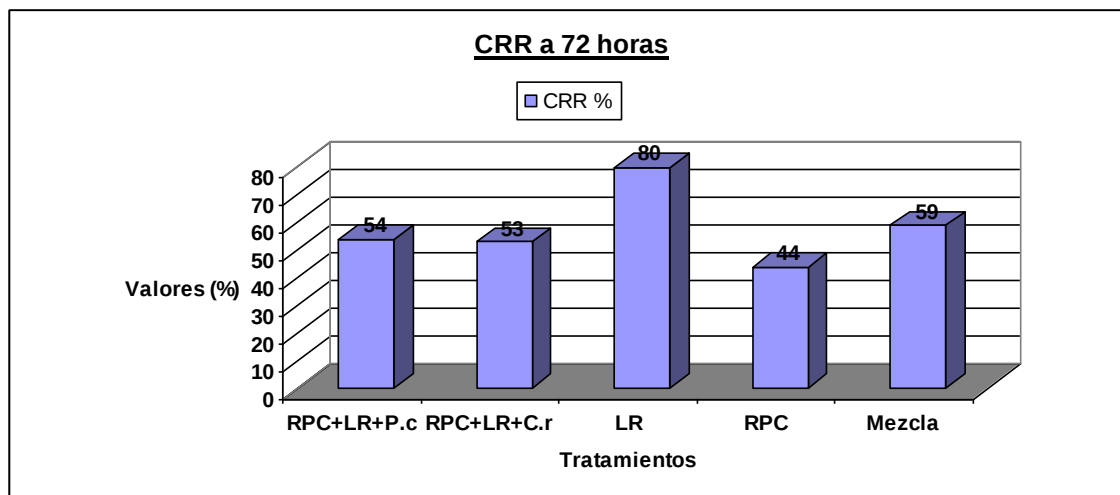


Figura 7. Crecimiento relativo de radícula (CRR) de semillas de la especie *E. globulus* a 72 horas de iniciado el ensayo, bajo los tratamientos: LR= lodo residual; RPC= residuos postcosecha; MEZCLA= residuos postcosecha + lodo residual; RPC+LR+P.c= lodo residual + residuos postcosecha + *P. chrysosporium*; RPC+LR+C.r= lodo residual + residuos postcosecha + *C. rigida*.

En la Figura 8, se observa que transcurridas 96 horas, el ensayo generó resultados similares a los alcanzados a las 72 horas. El nivel de CRR en el tratamiento LR, con un valor CRR de 97 %, se desarrolló de manera óptima con respecto al resto de los tratamientos, en los que el CRR no superó el 55 %; a pesar que ningún tratamiento superó el crecimiento alcanzado por el tratamiento Control.

No se observaron diferencias significativas entre los tratamientos Mezcla, RPC, RPC+LR+P.c y RPC+LR+C.r, los que fluctuaron entre un CRR de 49 % y 54 %, manteniendo la tendencia observada a las 72 horas.

Considerando los resultados mostrados en la Figura 8, a pesar que el tratamiento RPC+LR+P.c no registró efectos favorables en el crecimiento radicular de las plantas, los estudios indican que este hongo posee amplias habilidades para degradar un rango sumamente amplio de contaminantes medioambientales persistentes y tóxicos (Muñoz, 2004).

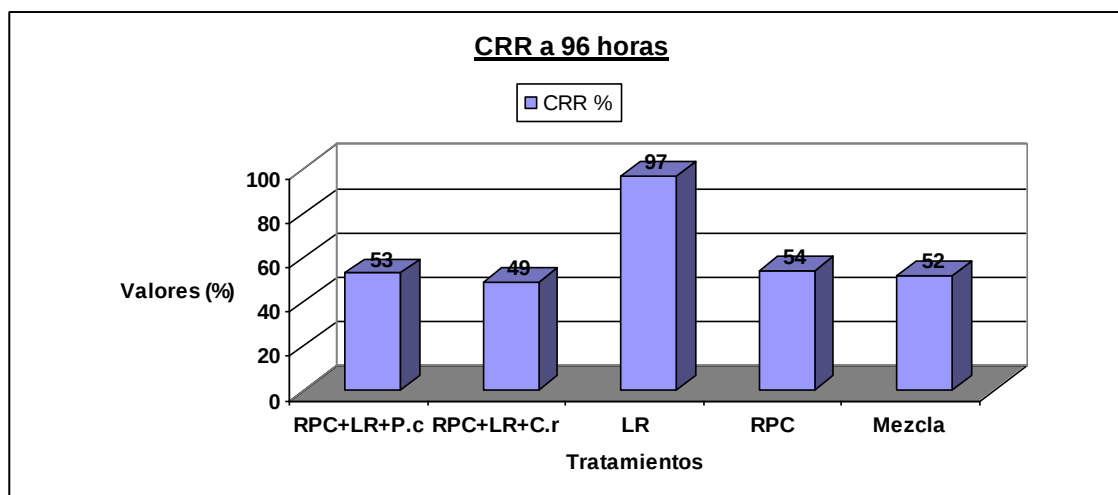


Figura 8. Crecimiento relativo de raíz (CRR) de semillas de la especie *E. globulus* a 96 horas de iniciado el ensayo, bajo los tratamientos: LR= lodo residual; RPC= residuos postcosecha; MEZCLA= residuos postcosecha + lodo residual; RPC+LR+P.c= lodo residual + residuos postcosecha + *P. chrysosporium*; RPC+LR+C.r= lodo residual + residuos postcosecha + *C. rigida*.

Como resultado de las mediciones de PGR y CRR expuestas anteriormente, de acuerdo al PGR se puede complementar que si bien en la mayoría de los tratamientos en los 4 momentos de medición se generó una respuesta favorable, al revelarse un índice de germinación por sobre el 50 % no debiera presentarse efectos fitotóxicos en las semillas. En cuanto al CRR, el crecimiento radicular de las especies de *E. globulus* se vio disminuido en todos los tratamientos durante las 3 mediciones, semejante a los resultados alcanzados por Pascual *et al.*, (1997) y Schultz *et al.*, (2004), que señalan que los ácidos orgánicos liberados por la degradación de la materia orgánica contenida en los biosólidos permite una mayor absorción de Cu y Zn, cambiando el ambiente químico de la raíz y provocando una elongación menor de la raíz.

4.2. Bioensayo 2: Desarrollo de *E. globulus* con aplicación de lodos residuales y en combinación con residuos postcosecha de trigo incubados con *Phanerochaete chrysosporium* y *Corioloopsis rigida* respectivamente.

Durante el transcurso del ensayo, de la totalidad de las plantas tratadas, ninguna presentó síntomas visibles de toxicidad que puedan atribuirse a una eventual acción negativa por la aplicación de lodo.

Todos los tratamientos ensayados mostraron un mayor crecimiento y desarrollo en comparación a las plantas Control.

Como era de esperar, en aquellas plantas inoculadas con hongos, después de seis semanas de incubación, a simple vista se produjo un incremento en el tamaño de las plantas, en comparación con los tratamientos con hongos incubados durante cero y tres semanas, generando biomasa aérea y radical más prominente.

En cuanto a los tratamientos con hongos a distintos tiempos de incubación, se observó notoriamente un menor crecimiento en las plantas tratadas con hongos a la tercera

semana de incubación. De forma general, en el ensayo se observaron plantas pequeñas tanto en la parte aérea como radical en todos los tratamientos, comparadas con las plantas de los diferentes bioensayos según cada período de incubación.

4.2.1. Lodo residual no inoculado y en combinación con residuos incubados con *Phanerochaete chrysosporium* y *Coriolopsis rigida* durante cero semanas respectivamente.

De acuerdo a lo observado en la Figura 9, respecto a la biomasa aérea, se muestra que las plantas Control y las tratadas con RPC+LR+P.c, fueron superadas ampliamente por las plantas tratadas con LR, donde se confirmaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos mencionados. Se observó además que las plantas presentaron un aspecto mas vigoroso, situación que puede ser atribuida en cierta manera al aporte en nitrógeno total que presenta el lodo (Del Val Muñoz, 1999), además de los altos contenidos de fósforo que presenta el suelo una vez que se aplica el tratamiento con éste (Brendecke *et al.*, 1993).

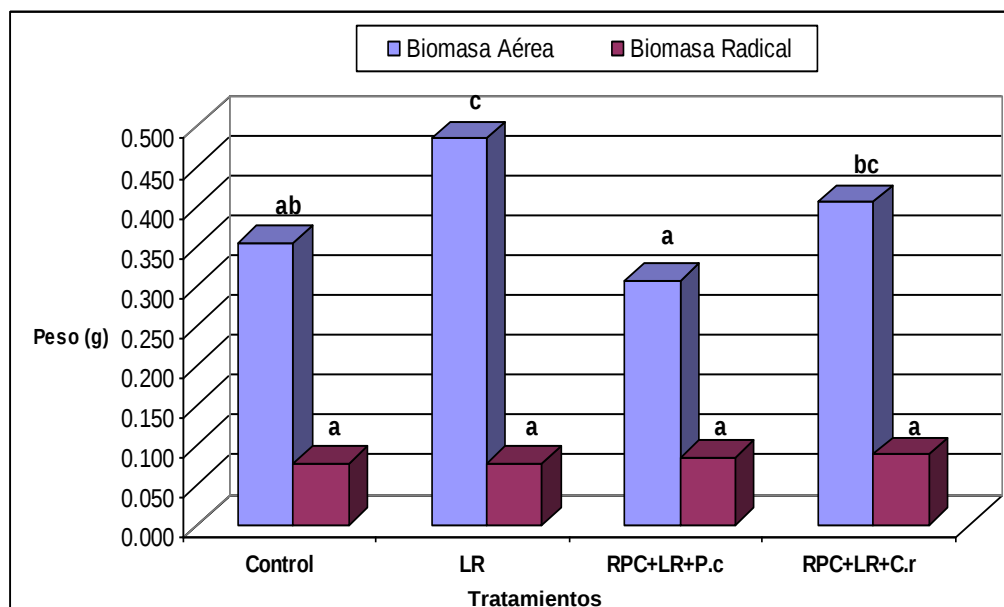


Figura 9. Biomasa aérea y radical de *E. globulus* bajo los tratamientos: LR= lodo residual no inoculado; RPC+LR+P.c= lodo residual + residuos postcosecha inoculados con *P. chrysosporium* al tiempo cero; RPC+LR+C.r= lodo residual + residuos postcosecha inoculados con *C. rigida*, al tiempo cero. Las letras en cada columna indican diferencias significativas del test de Duncan rango múltiple ($P \leq 0,05$).

El desarrollo de las plantas tratadas con RPC+LR+P.c, contrario a lo esperado, proporcionó como resultado una menor biomasa aérea, incluso menor que las plantas del tratamiento Control (Figura 9), donde es factible considerar lo descrito por Orrego (2007) y Arriagada (2001) respecto a que *P. chrysosporium* utiliza mecanismos de inmovilización de compuestos tóxicos, produciendo la no estimulación en el crecimiento de las plantas.

Sampedro (2005) estudió varios hongos saprobios en la eliminación de compuestos fenólicos tóxicos, alcanzando una degradación efectiva por algunos de estos hongos, haciendo posible una mejora en el desarrollo de plantas de *Glicine max* y *Lycopersicon esculentum*. Sin embargo, la incubación que fue de 2 semanas en este caso, produjo incrementos en algunos compuestos fitotóxicos, lo cual podría explicar el efecto adverso de *P. chrysosporium* en el desarrollo de las plantas.

En la Figura 9, se observa que los resultados emanados del tratamiento RPC+LR+C.r fueron positivos, indistintamente al tratamiento con LR, el cual arrojó una respuesta significativamente favorable en el aumento de biomasa aérea de las plantas, similar a los resultados obtenidos por Orrego (2007); lo que adicionalmente puede atribuirse a que por otra parte, el material postcosecha posee en sus tejidos macro y micro nutrientes, los mismos que se encuentran en los fertilizantes comerciales (Rouantet *et al.*, 1998).

Cabe señalar que en cuanto a la raíz, el ensayo no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los métodos comparados, permaneciendo cada una de las plantas de los procedimientos similar al tratamiento Control al momento de la cosecha.

4.2.2. Lodo residual no inoculado y en combinación con residuos incubados con *Phanerochaete chrysosporium* y *Corioloropsis rigida* durante tres semanas respectivamente.

Como resultado del bioensayo, al observar la Figura 10, todos los tratamientos demostraron diferencias significativas al tratamiento Control, indicando que la biomasa aérea se vio incrementada.

Nuevamente se observó un efecto positivo del tratamiento con LR en la biomasa aérea, apreciándose incrementos en su desarrollo; resultados sobresalientes que pueden ser atribuidos a las buenas concentraciones de macronutrientes presentes en el lodo y un incremento en los niveles de nitrógeno y fósforo disponible al aplicar el lodo de forma directa al suelo (Álvarez 2004).

Además se observa en la Figura 10, que en el caso de los tratamientos con hongos, existió un beneficio significativo en las plantas, lo que podría relacionarse a la incorporación de lodo residual, que aumenta la capacidad del suelo para retener nutrientes y provee de alimentos y energía para los microorganismos beneficiosos del suelo (Jacobs y McCreary, 2001) como los hongos, además de considerar el tiempo de

incubación del hongo (3 semanas), que permitiría un mayor desarrollo y acción de éste en la mezcla.

Los resultados positivos en el caso del tratamiento RPC+LR+C.r, concuerdan con lo obtenido por San Martín (2007), el que aplicó lodo incubado con hongos saprobios sobre plantas de *E. globulus*, demostrando que *C. rigida* estimula a las plantas respecto a su desarrollo en biomasa aérea en comparación con los tratamientos Control. Además, el aporte de los residuos es semejante a los resultados obtenidos por Borie *et al.*, (2002) que tras la adición de residuos orgánicos como trigo y lupino señala que se produjo un incremento de pH y P disponible en el suelo.

De acuerdo a la Figura 10, se señala que la producción de biomasa aérea en plantas de *E. globulus* a las cuales se les aplicó los diferentes residuos ensayados, (LR, LR+RPC+C.r y RPC+LR+P.c), mostró diferencias significativas con respecto a las plantas Control. Estos resultados concuerdan con lo obtenido por Arriagada *et al.*, (2009), quienes observaron un incremento en la producción de biomasa aérea en plantas de *E. globulus* inoculadas con *C. rigida* y *T. harzianum* en suelos con aplicación de lodos residuales en dosis similares a las utilizadas como enmienda orgánica. Cabe destacar que este tipo de incubación mostró un menor desarrollo debido probablemente a un efecto de bajas temperaturas a las cuales estuvo expuesto el invernadero.

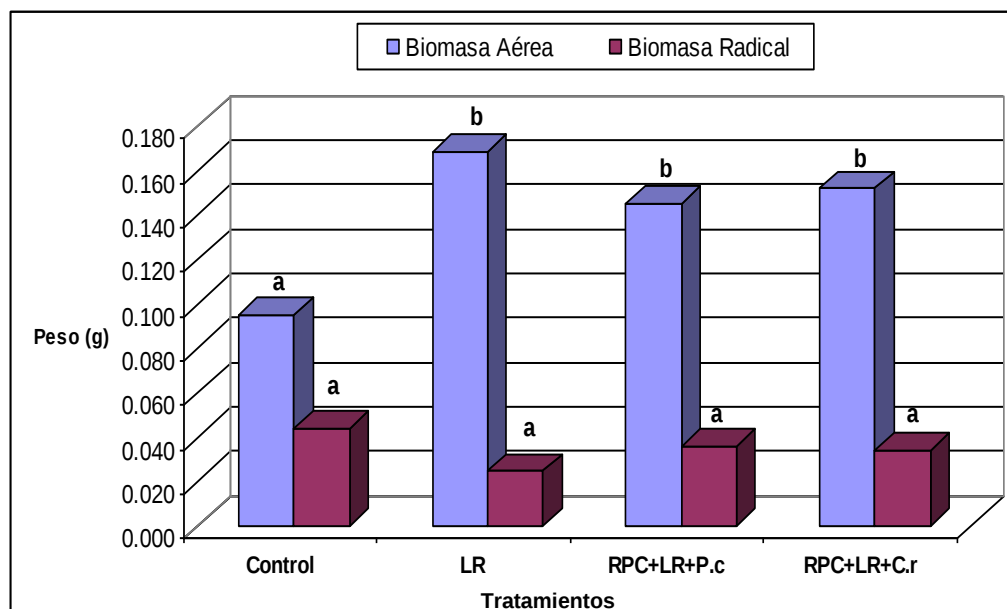


Figura 10. Biomasa aérea y radical de *E. globulus* bajo los tratamientos: LR= lodo residual no inoculado; RPC+LR+P.c= lodo residual + residuos postcosecha inoculados con *P. chrysosporium* después de tres semanas de incubación; RPC+LR+C.r= lodo residual + residuos postcosecha inoculados con *C. rigida*, después de tres semanas de incubación. Las letras en cada columna indican diferencias significativas del test de Duncan rango múltiple ($P \leq 0,05$).

De acuerdo a esta misma Figura 10, ninguno de los tratamientos genera alguna estimulación de la biomasa radical hasta niveles estadísticamente significativos.

4.2.3. Lodo residual no inoculado y en combinación con residuos incubados con *Phanerochaete chrysosporium* y *Corioloopsis rigida* durante seis semanas respectivamente.

En forma general fue posible observar el buen desarrollo alcanzado por las plantas tratadas con lodo residual, demostrando una mayor producción de biomasa aérea, estadísticamente significativa con respecto a las plantas Control (Figura 11), logrando además un incremento significativo en relación a las plantas con aplicación de RPC combinados con LR e incubados con *P. chrysosporium* y *C. rigida* respectivamente, las cuales se desarrollaron de manera similar a las plantas Control.

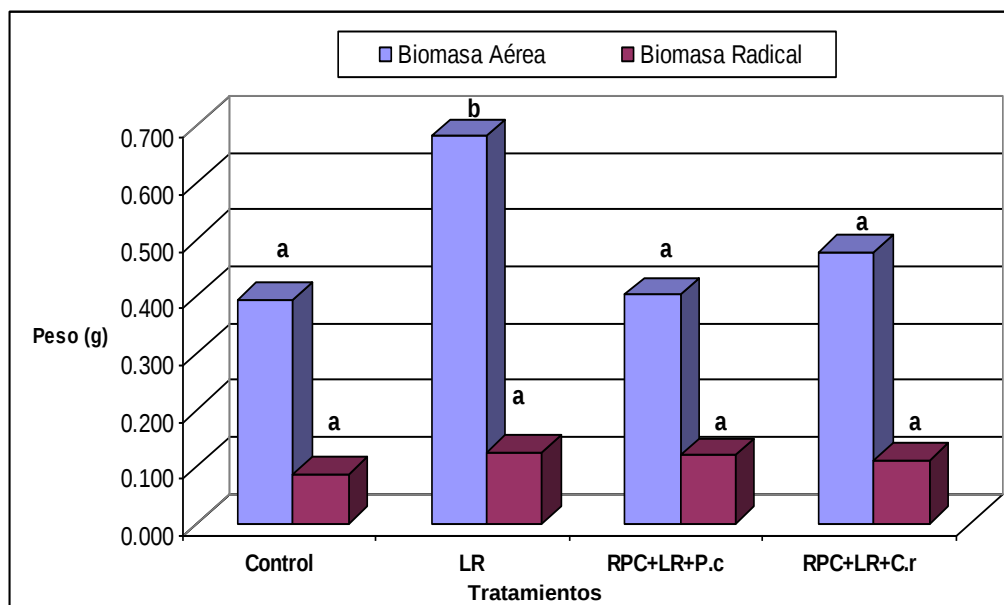


Figura 11. Biomasa aérea y radical de *E. globulus* bajo los tratamientos: LR= lodo residual no inoculado; RPC+LR+P.c= lodo residual + residuos postcosecha inoculados con *P. chrysosporium* después de seis semanas de incubación; RPC+LR+C.r= lodo residual + residuos postcosecha inoculados con *C. rigida*, después de seis semanas de incubación. Las letras en cada columna indican diferencias significativas del test de Duncan rango múltiple ($P \leq 0,05$).

Los macronutrientes presentes en los lodos residuales aportan una fuente de nutrientes para las plantas, que junto a sus componentes orgánicos promueven el acondicionamiento de los suelos (Logan y Harrison, 1995). La aplicación de este residuo al suelo tiende a mejorarlo debido a que aumenta la estabilidad de los agregados y la retención de agua, optimizando su absorción por parte de las plantas (Núñez *et al.*, 2007). El uso de estas enmiendas en el suelo puede mejorar la productividad de éste y aumentar la presencia de algunos nutrientes limitantes del suelo, tales como N y P (Cox *et al.*, 2001), de lo cual podría deducirse que el pH del suelo donde se efectuó el tratamiento fluctuaría en rangos cercanos a 7, nivel en el cual incrementa la disponibilidad de estos nutrientes en el suelo y se vuelven mas asimilables por la planta.

Según la Figura 11, la aplicación de RPC+LR+C.r, produjo efectos positivos en el aumento de la biomasa aérea de las plantas, en comparación al desarrollo de las plantas

Control. Pese a estos resultados, los incrementos no fueron significativamente mayores que el Control (Figura 4). Según Vassilev y Vassileva, (1992), los resultados favorables se deberían a la producción de ácidos orgánicos por parte de *C. rigida*, los cuales solubilizarían el P presente en el lodo.

En la Figura 11, se observó que las plantas tratadas con RPC+LR+P.c no arrojaron resultados estadísticamente significativos, generando plantas con un desarrollo similar a las plantas del tratamiento Control.

Correspondería esperar un incremento en la biomasa de las plantas de los tratamientos RPC+LR+P.c y RPC+LR+C.r, por la acción del hongo sobre el residuo, pero es probable que el lodo residual haya contribuido a la supresión de la acción del hongo durante la degradación del residuo, considerando además que algunos de los nutrientes presentes en el lodo podrían haber sido adsorbidos por el residuo antes de ser utilizados por la planta.

El desarrollo radicular mostrado en la Figura 11, se comportó de manera similar en todos los tratamientos, donde no se diferenciaron incrementos significativos en la biomasa radical de las plantas de *E. globulus*.

4.2.4. Actividades enzimáticas lacasa y manganeso peroxidasa.

4.2.4.1. Determinación de lacasa y manganeso peroxidasa (MnP) en condiciones in-vitro.

Según se observa en la Figura 12, el residuo RPC en combinación con LR incubado con *P. chrysosporium*, exhibió actividad enzimática lacasa en disminución a medida que transcurrió el tiempo de incubación. Se manifestó mayor actividad de esta enzima a la semana cero de incubación del hongo, situación inversa a lo esperado considerando los resultados del bioensayo de plantas, en el cual se registró una disminución de la

biomasa aérea en plantas de *E. globulus* tratadas con este período de incubación del hongo.

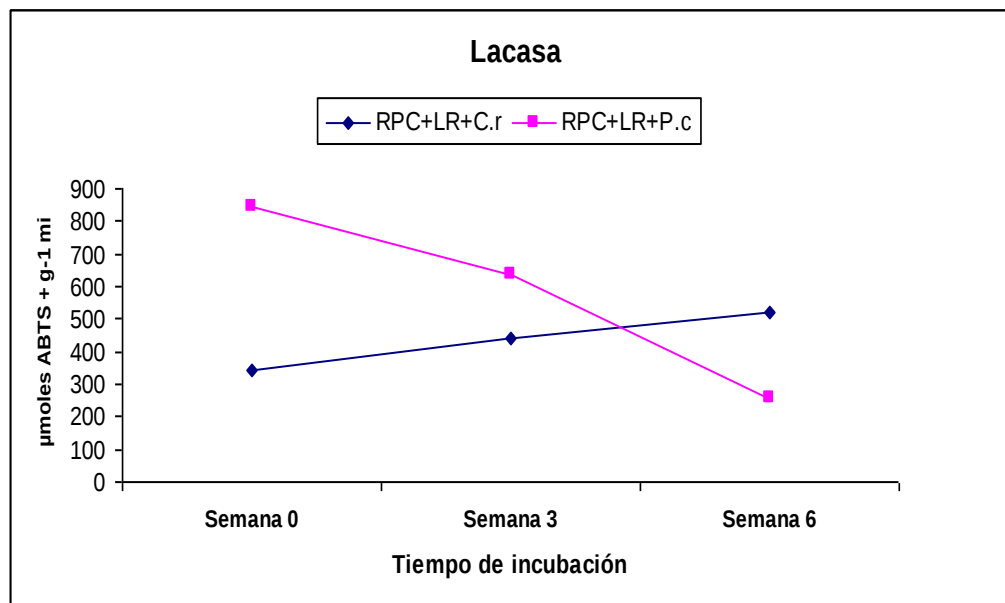


Figura 12. Actividad lacasa en condiciones in-vitro con los tratamientos: RPC+LR+P.c= lodo residual + residuo postcosecha + *P. chrysosporium*, incubados a 3 tiempos; RPC+LR+C.r= lodo residual + residuo postcosecha + *C. rigida*, incubados a 3 tiempos.

Residuo RPC en combinación con LR incubado con *C. rigida*, revela una situación contraria a lo expuesto en el caso anterior. De acuerdo aumenta el tiempo de incubación del hongo, se mostró un incremento de actividad enzimática lacasa (Figura, 12). Esta situación no se reflejó confrontada al desarrollo de la biomasa aérea del bioensayo N° 2, para el caso de la semana 3 y 6 de incubación; en la semana seis de incubación del hongo se exhibió un aumento en los niveles de biomasa aérea, situación congruente con el aumento de la actividad enzimática.

En la Figura 13, se observó que ambas composiciones, (residuo en combinación con lodo incubado con *P. chrysosporium* y residuo en combinación con lodo incubado con *C. rigida*), presentaron una estabilidad en su actividad MnP, siendo el segundo tratamiento mencionado el que presentó mayores variaciones, con un ligero

decrecimiento de la actividad enzimática MnP a la tercera semana de incubación, escenario que al ser comparado con los resultados obtenidos en el ensayo de plantas no reflejó los cambios en la biomasa aérea que allí se proyectaron.

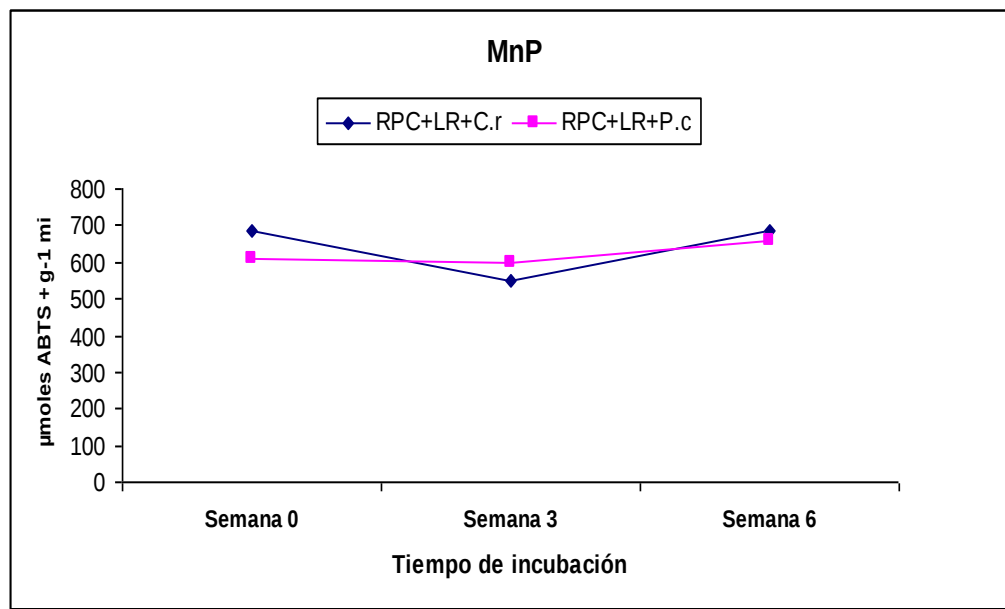


Figura 13. Actividad Mn Peroxidasa en condiciones in-vitro con los tratamientos: RPC+LR+P.c= lodo residual + residuo postcosecha + *P. chrysosporium*, incubados a 3 tiempos; RPC+LR+C.r= lodo residual + residuo postcosecha + *C. rigida*, incubados a 3 tiempos.

4.2.4.2. Determinación de Lacasa y Manganese peroxidasa (MnP) a nivel de suelo rizosférico.

En la Figura 14, se observó que el tratamiento con residuo en combinación con lodo incubado con *P. chrysosporium*, demostró una actividad enzimática con escasas variaciones, con un incremento reducido de esta actividad a la sexta semana de incubación del hongo, situación que puede ser percibida en el bioensayo de plantas, en el cual no se observaron incrementos significativos en la biomasa aérea con este tratamiento.

Considerando los resultados de la Figura 14, el tratamiento que presentó mayor actividad lacasa, corresponde a residuo en combinación con lodo inoculado con *C. rigida* a la sexta semana de incubación. Esto, a pesar que se observó un leve acrecentamiento, no logró proyectar incrementos significativos en la biomasa aérea de las plantas del bioensayo 2.

En la Figura 14, con respecto a la tercera semana de incubación del hongo, la actividad lacasa se mantuvo constante en los diferentes tratamientos aplicados al bioensayo. En el caso del lodo residual, se observaron notorios incrementos de actividad lacasa en las semanas 3 y 6 de incubación, en concordancia al aumento significativo en biomasa aérea de las plantas del bioensayo 2.

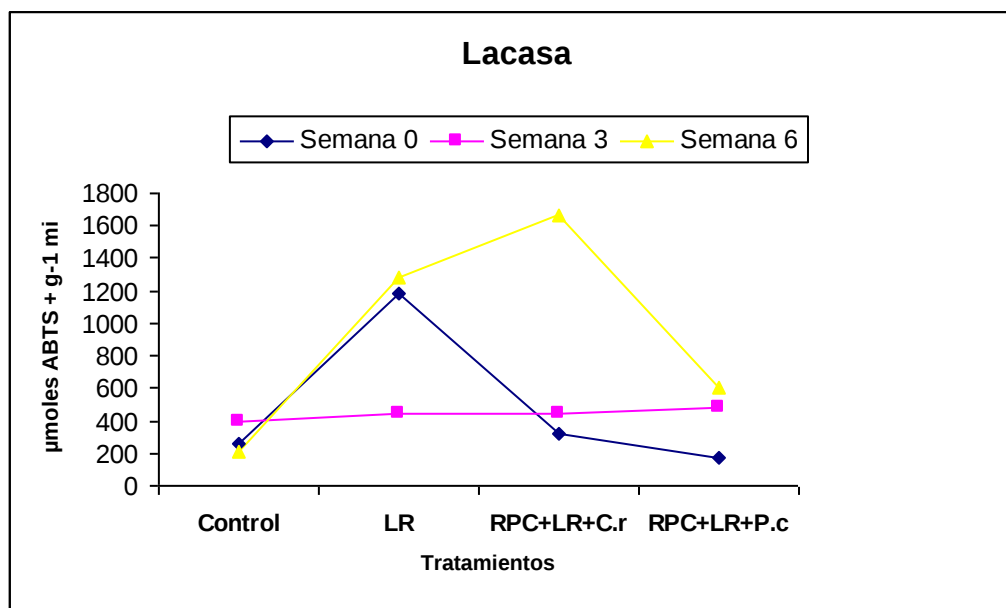


Figura 14. Actividad lacasa a nivel de suelo rizosférico en los tratamientos: RPC+LR+P.c= lodo residual + residuo postcosecha + *P. chrysosporium* según cada semana de incubación del hongo; RPC+LR+C.r= lodo residual + residuo postcosecha + *C. rigida* según cada semana de incubación del hongo; LR= lodo residual.

Como se observa en la Figura 15, los valores arrojados por la enzima MnP se mantuvieron constantes para los ensayos con residuo en combinación con lodos

residuales inoculados con hongos a la semana cero y seis de incubación. A la tercera semana de incubación se incrementaron los valores de esta actividad enzimática, situación que concuerda en relación a la biomasa aérea del ensayo de plantas, observando un incremento significativo en todos los tratamientos, en comparación con las plantas Control. Es posible que distintas condiciones microambientales como pH, temperatura, grado de humedad, puedan favorecer la actividad de distintos sistemas enzimáticos de modo diferencial (Papinuti *et al.*, 2003). Si comparamos esta situación con lo descrito por Hofrichter (2002) debería presentarse un incremento en los niveles de actividad en la sexta semana de incubación del hongo, ya que los productores de las enzimas ligninolíticas, son principalmente los hongos de pudrición blanca, los que se desarrollan en la fase final del proceso de compostaje. Estas enzimas juegan un rol preponderante en la degradación de compuestos carbonatados como lignina.

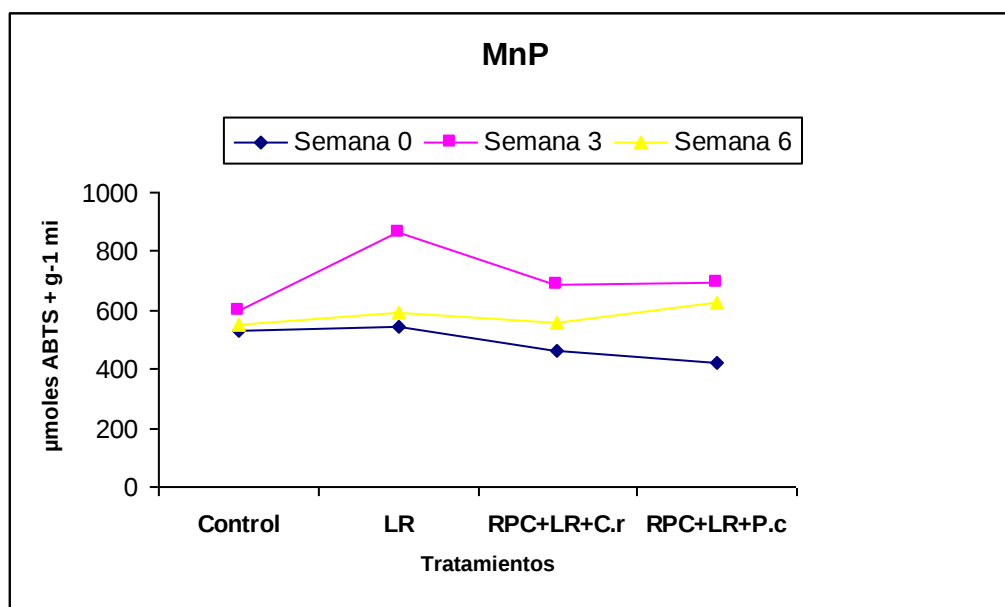


Figura 15. Actividad MnP a nivel de suelo rizosférico en los tratamientos: RPC+LR+P.c= lodo residual + residuo postcosecha + *P. chrysosporium* según cada semana de incubación del hongo; RPC+LR+C.r= lodo residual + residuo postcosecha + *C. rigida* según cada semana de incubación del hongo; LR= lodo residual.

Según la Figura 15, claramente existió menor actividad MnP en el bioensayo con hongos a la semana cero de incubación. Rodríguez y Toca-Herrera, (2007) explican que

una baja o nula actividad depende de distintos factores que afectarían la activación de estas enzimas, como son el hecho de que estas trabajan en condiciones de metabolismo secundario, por lo cual deben superar condiciones como el crecimiento descontrolado del hongo, la formación de polisacáridos alrededor del micelio y la secreción de ciertos compuestos como proteasas las cuales podrían inactivar las enzimas.

Al analizar los resultados se debe considerar que las enzimas de los suelos y las reacciones que catalizan son dependientes de una multitud de factores tales como pH, temperatura, presencia o ausencia de inhibidores, entre muchos otros (Burns, 1978).

5. CONCLUSIONES

Sobre la base de los resultados obtenidos en los bioensayos y su posterior discusión anteriormente presentados, es posible concluir lo siguiente:

- Los tratamientos LR, mezcla y mezcla incubada con *C. rigida* generaron un incremento en la capacidad germinativa de *E. globulus* durante todas las mediciones.
- A 72 horas de iniciado el ensayo hubo un aumento en la germinación de *E. globulus* de manera general.
- La aplicación de LR por si solo provocó el mayor aumento significativo en la biomasa aérea de plantas de *E. globulus*.
- En forma general el ensayo a la tercera semana de incubación generó los mayores incrementos significativos en biomasa aérea en todos los tratamientos con respecto al control.
- En el tratamiento con *P. chrysosporium* incubado (semana 0 de incubación) y *C. rigida* (semana 6 de incubación) se presenta la mayor actividad lacasa en condiciones in-vitro.
- La actividad enzimática lacasa, a nivel de suelo rizosférico, fue superior en el tratamiento en que se adicionó *C. rigida* incubado durante seis semanas.
- A nivel general la actividad MnP en suelo rizosférico fue mayor en todos los tratamientos a la semana seis de incubación.

6. RESUMEN

En el presente estudio se evaluó el efecto de lodos residuales provenientes de plantas de tratamiento de aguas servidas (PTAS), por si solo y en combinación con residuos ligninolíticos postcosecha de trigo incubados con los hongos degradadores de lignina *Phanerochaete chrysosporium* y *Coriolopsis rigida*, aplicados a ensayos de plantas en su fase inicial de crecimiento y germinación de semillas de la especie *Eucalyptus globulus*.

Se realizaron 2 bioensayos. En el primer bioensayo se evaluó el porcentaje de germinación relativa (PGR) y el crecimiento relativo de radícula (CRR) en cultivo (in-vitro) de semillas a las 24 - 48 - 72 y 96 horas de iniciado el ensayo. En el segundo bioensayo se evaluó las diferencias en biomasa aérea y radical durante el desarrollo de las plantas y se determinó la actividad enzimática Lacasa y Manganese peroxidasa (MnP) en condiciones in-vitro y a nivel de suelo rizosférico

Los resultados indican que en el ensayo de germinación, el PGR da como resultado general porcentajes mayores de germinación que el tratamiento control. El tratamiento que presenta valores superiores de PGR es el tratamiento mezcla (lodo residual + residuo postcosecha de trigo). En el caso del CRR el ensayo exhibió en todos los tratamientos valores inferiores al tratamiento control. El tratamiento que arroja mejores resultados es lodo residual (sin incubar), aunque no supera al tratamiento control.

En forma global en el ensayo de plantas se obtuvo resultados positivos con cada uno de los tratamientos. Se indica que el tratamiento que proporciona el mayor aumento significativo en la biomasa aérea es lodo residual. No se presentan diferencias significativas en la biomasa radical.

7. SUMMARY

In this study was evaluated the effects of sewage sludge from wastewater treatment plants in combination or not with lignocellulosic residue (wheat straw) incubated with the white rot fungus *Coriolopsis rigida* and *Phanerochaete chrysosporium*. Was realized bioassay with seeds and plants of *Eucalyptus globulus* to determinate the effects.

Two bioassays was realized. In the first bioassay, relative germination percentage (PGR) and relative growth of radicle (RR) were evaluated in vitro using seeds of *E. globulus*. The evaluation times were 24 - 48 - 72 and 96 hours once started the bioassay. The second bioassay both shoot and root dry weight was evaluated. The enzymatic activities Lacase and Manganese peroxidase (MnP) was evaluated both in vitro and soil.

In vitro bioassay, the PGR of all treatments were higher than control being the treatment with sewage sludge + wheat straw the highest. While, in the CRR all treatments were lower in comparison with control. In this case the best treatment was sewage sludge but is lower than control treatment.

In the plants bioassay each treatment affected positively the parameters evaluated. Shoot dry weight was higher with sewage sludge treatment obtaining a significant growth. No significant differences were detected in root dry weight.

8. LITERATURA CITADA

Acuña, O., Peña, W., Serrano, E., Pocasangre, L., Rosales, F., Delgado, E., Trejos, J. y Segura, A. 2006. La importancia de los microorganismos en la calidad y salud de suelos. XII reuñiao internacional da associacao para a cooperacao nas pesquisas sobre bananas no caribe e na América tropical. 15 a 20 de outubro de 2006. Joinville. Santa Catarina. Brasil.

Alcota, C. 2002. Acondicionamiento de biosólidos mediante compostaje. Tesis para optar al título de ingeniero civil. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, 175 p.

Álvarez, L. 2004. Mineralización *in vitro* de nitrógeno y fósforo y contenido de metales pesados en suelos acondicionados con lodo proveniente de una planta de tratamiento de aguas servidas. Tesis Ingeniero en Recursos Naturales Renovables. Facultad de ciencias agronómicas. Universidad de Chile. Santiago, Chile. 64 p.

Aranda, E. 2006. Fraccionamiento físico del alpeorajo como base para desarrollar una estrategia biológica con hongos saprobios y arbusculares para la eliminación de su fototoxicidad. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. 281 p.

Aranda, E; García-Romera, L; Ocampo, J.A.; Carbone, V.; Malorni, A.; Sannino, F.; De Martino, A. and Capasso, R. 2007. Reusing ethyl acetate and aqueous exhausted fractions of dry olive mill residue by saprobe fungi. *Chemosphere* 66: 67-74.

Arriagada, C. 2001. Restauración forestal de suelos contaminados por metales pesados. Uso de hongos saprobios y micorrícicos como herramienta de mejora medioambiental. Tesis doctoral. ETSIAM. Universidad de Córdoba. España. 221 p.

Arriagada, C., Aranda, E., Sampedro, I., Garcia-Romera, I. y Ocampo, J.A. 2009. Interactions of *Trametes versicolor*, *Coriolopsis rigida* and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus deserticola* on the copper tolerate of *Eucalyptus globulus*. *Chemosphere*. 77: 273 – 278.

Arriagada, C.A, Herrera, M.A. and Ocampo, J.A. 2005. Contribution of arbuscular mycorrhizal and saprobe fungi to the tolerance of *Eucalyptus globulus* to Pb. *Water, Air and Soil Pollution*. 166: 31-47.

Asamudo, N.U., Daba, A.S., Ezeronye, O.U. 2005. Bioremediation of textile effluent using *Phanerochaete chrysosporium*. *African Journal of Biotechnology*. 4 (13):1548-1553.

Baldrian, P. 2002. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme and Microbial Technology*. 32: 78 – 91.

Baldrian, P. And Snajdr, J. 2006. Production of ligninolytic enzymes by litter-decomposing fungi and their ability to decolorize synthetic dyes. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 1023-1029.

Baraňao, P. y Tapia, L. 2004. Tratamiento de las aguas servidas: Situación en Chile. Domestic wastewater treatment: the chilean situation. *Ciencia & Trabajo (Chile)*. 6(13): 111-117.

Bayramoglu, G., Bekta, S. y Yakup, M. 2003. Biosorption of heavy metal ions on immobilized White-rot fungus *Trametes versicolor*. *Journal of Hazardous Materials*. 101: 285 – 300.

Beare, M.H., Parmelee, R.W., Hendrix, P.F., Cheng, W., Coleman, D.C., Crossley, D.A. Jr. 1992. Microbial and faunal interactions and effects on litter nitrogen and decomposition in agroecosystems. *Ecological Monographs* 62: 569-591.

Borie, F; Redel, Y.; Rubio, R. and Rouanet, J. 2002. Interaction between crop residues application and micirrhizal development and some soil-root interface properties and mineral acquisition by plants in acidic soil. *Biol fertile soil*. 151-160.

Bourbonnais, R. And Paice, M. G. 1990. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded Role for Laccase. *Lignin Biodegradation*. FEBS Letters. 267: 99-102.

Brendecke, J. W., Axelson, R. D. Y Depper, I. L. 1993. Soil microbial activity as an indicator of soil fertility: long- term effects of municipal sewage sludge on an arid soil. *Soil. Biol. Biochem*. 25: 751-758.

Burns, R. G. 1978. Enzyme activity in soil. Some theoretical and practical considerations. En: Burns, R. G. Ed. *Soil enzymes*. Academic Press, Inc. New York.

Bustamante, M., 1999. Diseño conceptual de la disposición de lodos y biosólidos provenientes de plantas de tratamiento de aguas servidas. Tesis para optar al Título de Ingeniero Civil Químico. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. Chile. 42p.

Caffarel, S., Martínez, A., Moreno, I. y Martínez, A.D. 2002. Biotransformación de anilinas sustituidas, mediante isoenzimas producidas por *Phanerochaete chrysosporium* inmovilizado. Laboratorio de Ingeniería Bioquímica, Sub. De Investigación, Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec. Ecatepec de Morelos, Edo de Mex.

CONAMA. 1999. Reglamento para el manejo de lodos no peligrosos generados en plantas de tratamiento de aguas. 24 p.

Cortez, E. 2003. Fundamentos de ingeniería para el tratamiento de biosólidos generados por la depuración de aguas servidas de la región Metropolitana. Tesis para optar al Título de Ingeniero Civil. Santiago, Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, 102 p.

Cox, D., Bezdicek, D., Fauci, M. 2001. Effects of compost, coal ash, and straw amendments on restoring the quality of eroded Palouse soil. *Biol Fertil Soils*. 33: 365 – 72.

Del Val Muñoz, C. 1999. Diversidad de hongos formadores de micorrizas arbusculares en suelos contaminados con metales pesados. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. España. 230 p.

Frioni, L. 1990. Ecología microbiana del suelo. Departamento de Publicaciones y Ediciones de la Universidad de la República (Ed). Montevideo, Uruguay. 519p.

González-Río, F., Castellanos, A., Gómez, C. y Fernández, O. 1997. Manual de silvicultura de Eucalipto. www.scribd.com/doc/38685975/Manual-de-la-Madera-de-Eucalipto-Blanco. Visitada el 12 de septiembre de 2010.

González, J. 2008. Efecto del fraccionamiento de lodos residuales provenientes de plantas de tratamiento de aguas servidas incubados con hongos saprobios y aplicados sobre especies vegetales de interés. Tesis Ingeniero Forestal. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales. Universidad de la Frontera. Temuco, Chile. 100 p.

Hackl, E., Pfeffer, M., Donat, C., Bachmann, G., Zechmeister-Boltenstern, S. 2005. Composition of the microbial communities in the mineral soil under different types of natural forest. *Soil & Biochemistry*. 37: 661-671.

Hofrichter, M. 2002. Review: ligninconversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology*. Helsinki. Finlandia. 30: 454 – 466.

Jacobs, L. y Mc Creary D. 2001. Utilizing Biosolids on Agricultural Land. Department of Crop and Soil Sciences Michigan State University. Extension Bulletin E-2781. p.5-9.

Leppe, A. 2007. Simposio Internacional de Lodos: Usos Benéficos. Charla Magistral. Instituto del Medio Ambiente. 29-30 de Marzo de 2007. Universidad de la Frontera. Temuco. Chile.

Logan, T. J., Harrison, B.J., 1995. Physical characteristic of alkaline stabilized sewage sludge (N-Vitro soil) and their effects on soil physical properties. *J. Environ. Qual.* 24: 153-164.

Madrid, F., De La Rubia, T. y Martínez, J. 1996. Effect of *Phanerochaete flavidol-alba* on aromatic acids in olive oil mill waste waters. *Technological and Environmental Chemistry* 51: 161-168.

Mc Allister, C. B., Garcia-Garrido, J.M., Garcia-Romera, I., Godeas, A. and Ocampo, J. A. 1996. In Vitro interactions between *Alternaria alternata*, *Fusarium equiseti* and *Glomus mosseae*. *Symbiosis* 20: 163-174.

Mendgen, K. y Deising, H. 1993. Infection structures of fungal plant pathogens: acytological and physiological evaluation. *New Phytol.* 124: 193-213.

Metcalf & Eddy, Inc. 1998. "Ingeniería de Aguas Residuales. Tratamiento, Vertido y Reutilización". Vol. II, 3ª Ed., Mc Graw-Hill, España. Pp. 865-737.

Muñoz, G. 2004. Transformación de clorofenoles por hongos de pudrición blanca. Tesis para optar al título de Ingeniero Ambiental. Facultad de Ingeniería, Ciencias y Administración. Universidad de la Frontera. Temuco. Chile. 81 p.

Núñez, M., Millar, D., Lara, V., Riquelme, A., Barahona, J., Alvear, M. y Salazar, I. 2007. Efecto benéfico en algunas propiedades físicas, químicas y biológicas de un andisol por efecto de la adición de diferentes dosis de lodos procedentes de una planta de tratamiento de aguas servidas, en una siembra primaveral tardía de trigo. Simposio Internacional de Lodos: Usos Benéficos. Instituto del Medio Ambiente. Universidad de la Frontera. Temuco. Chile. 14p.

Ojeda, G., Alcaláñiz, J.M., Ortiz, O. 2003. Runoff and losses by erosion in soils amended with sewage sludge. *Land Degradation and Development.* 14: 563-573.

Orrego, S. 2007. Efecto de los lodos residuales provenientes de plantas de tratamiento de aguas servidas incubados con hongos saprobios sobre el crecimiento de *Eucalyptus globulus* Labill. Tesis para optar al título de Ingeniero Forestal. Facultad de Cs. Agropecuarias y Forestales. Universidad de la Frontera. Temuco. Chile. 96 p.

Papinutti, L., Diorio, L. Y Forchiassin, F. 2003. Degradación de madera de Álamo por *Fomes sclerodermeus*: producción de enzimas ligninolíticas en aserrín de álamo y cedro. *Iberoamericana Micología.* 20: 16 – 20.

Paszczynski, A. Crawford, R. And Huynh, V.B., 1998. Manganese peroxidase of *phanerochaete chrysosporium*: Purification Methods. *Enzymology.* 161: 264-270.

Pascual, I., Antolín, M., García, P., Polo, A. y Sánchez, M. 2007. Effect of water deficit on microbial characteristics in soil attended with sewage sludge or inorganic fertilizer under laboratory conditions. *Bioresource Technology*. 98: 29-37.

Pomares, F. 2001. Problemáticas de los suelos agrícolas: aplicación de lodos de depuradora. Curso sobre contaminación de suelos y aguas subterráneas. Documento resumen. Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. Valencia, España. 17 p.

Pozdnyakova, N; Rodakiewicz-Nowak, J; Turkovskaya, O and Haber, J. 2006. Oxidative degradation of polyaromatic hydrocarbons catalyzed by blue laccase from *Pleurotus ostreatus* D1 in the presence of synthetic mediators. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 1242-1249.

Rivas, C. 2005. Estabilización de lodo proveniente de la Planta de Tratamiento de Aguas Servidas de la ciudad de Vilcún, mediante el proceso de compostaje. Tesis para optar al título de Ingeniero Civil Industrial mención Agroindustrias. Universidad de la Frontera. Temuco. Chile. 95 p.

Rodakiewicz-Nowak, J. 2000. Phenol oxidizing enzyme in water-restricted media. *Topic in Catalysis*. 11: 419-434.

Rodakiewicz-Nowak, J.; Jarosz-Wilkolazka, A. And Luterek, J. 2006. Catalytic activity of versatile peroxidase from *Bjerkandera fumosa* in aqueous solutions of water-miscible organic solvents. *Applied Catalysis A: General* 308 : 56-61

Rodríguez, M. 2007. Higienización de lodos de digestión anaerobia de la Planta de Tratamiento de Aguas Servidas de la ciudad de Osorno mediante el proceso de compostaje. Tesis Ingeniero Ambiental. Facultad de Ingeniería, Ciencias y Administración. Universidad de la Frontera. Temuco, Chile. 75p.

Rouanet, J., Pino, I., Schurch, A. y Schurch, W. 1998. Sistema de producción cero labranza. Importancia del manejo de residuo postcosecha. www.inia.cl/medios/biblioteca/serieactas/NR25086.pdf. Visitada el 11 de Septiembre de 2010.

Sampedro, I. 2005. Disminución de la fitotoxicidad del alperujo seco y extractado por hongos saprobios y arbusculares. Tesis doctoral. Facultad de ciencias. Universidad de Granada. 256 p.

San Martín, P. 2007. Desarrollo de *Eucalyptus globulus* Labill. Inoculado con micorrizas arbusculares y hongos saprobios, cultivado bajo distintas dosis de un extracto liquido de lodos residuales procedentes de la planta de tratamiento de aguas servidas de

Vilcún (IX Región, Chile). Tesis Ingeniero Forestal. Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales. Universidad de la Frontera. Temuco, Chile. 92 p.

Sanchez, C., 2008. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*. 27: 185 – 194.

Sánchez, P. 2005. Recuperación de suelos degradados por aplicación de residuos orgánicos urbanos. Curso Internacional: “Condicionantes de los lodos de depuradoras urbanas para su aplicación en suelos y su normativa legal. Situación actual de la Unión Europea y en España”. 7 de octubre. 2005.

Schultz, E., Joutti, A., Raisanen, M.L., Lintinen, P., Martikainen, E. y Lehto, O. 2004. Extractability of metals and ecotoxicity of soils from two old wood impregnation sites in Finland. *Sci. Total. Environ.* 326 (1-3): 71-84.

Soanez, M. 1999. Aguas Residuales Urbanas. Tratamientos Naturales de bajo costo y aprovechamiento. 2º Ed., Mundi-Prensa, España.

Strasburger, C., Noll, F., Schenck, H. y Schimper, A. 1994. Tratado de Botánica. Ediciones Omega. Octava edición en español. 1070 p.

Tevere, M., Read, J.S Mattiason, B. 2005. Polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation in extracellular fluids and static batch cultures of selected sub-tropical white rot fungi. *Journal of Biotechnology*. 115:367-377.

Tiquia, S. M. 2000. Evaluating phytotoxicity of pig manure from the pig-on-litter system. En: P.R. Warman y B.R. Taylor (ed). *Proceedings of the International Composting Symposium*. CBA Press Inc. N. S. p. 625-642.

Toro, F. 2005. Áreas Potenciales para la aplicación de Biosólidos en Plantaciones Forestales de la VI región de Chile. Memoria de Ingeniero Forestal. Facultad de Ciencias Forestales. Universidad de Chile. 74p.

Van Beek, T; Kuster, B; Claassen, F; Tienvieri, T; Bertaud, F; Lenon, G; Petit-Conil, M and Sierra-Álvarez, R. 2006. Fungal bio-treatment of spruce wood whit *Trametes versicolor* for pitch control: Influence on extractive contents, pulping process parameters, paper quality and effluent toxicity. *Bioresource Technology* 98: 302-311.

Varnero, M. T., Rojas, C. y Orellana, R. 2007. Índices de fototoxicidad en residuos orgánicos durante el compostaje. *R. C. Suelo nutr. Veg.* 7 (1): 28.37.

Vassilev, N y Vassileva, M. 1992. Production of organic-acid by immobilized filamentous fungi. *Mycological research* 96: 563-570.

9. ANEXOS

ANEXO 1



Figura 1: Invernadero de ambiente controlado.

ANEXO 2

Cuadro 3: Composición medio de cultivo EMA (Extracto de Malta Agar).

Para 1 litro:

Maltosa técnica.....	12,75 g
Dextrina.....	2,75 g
Glicerol.....	2,35 g
Peptona.....	0,78 g
Agar.....	15,0 g
Agua.....	1 L

Cuadro 4: Composición medio de cultivo PDA (Papa Dextrosa Agar).

Para 1 litro:	
Almidón de patata.....	4,0 g
Dextrosa.....	20,0 g
Agar.....	15,0 g
Agua.....	1 L

ANEXO 3

Cuadro 5: Composición medio PDB.

Para 1 litro:	
Almidón de patata.....	4,0 g.
Dextrosa.....	20,0 g.

ANEXO 4



Figura 1: Plantas cosechadas en horno de ventilación forzada.

ANEXO 5

Figura 3: Bioensayo 2. Ensayo de plantas.

