

**UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE
APURÍMAC**

FACULTAD DE INGENIERÍA

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL**



**“EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE BIORREMEDIACIÓN DE AGUA
CON METALES PESADOS USANDO BIOMASA DE BASIDIOMICETOS
PROVENIENTES DEL SANTUARIO NACIONAL DEL AMPAY”**

**TESIS PARA OPTAR TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO
AGROINDUSTRIAL**

YULY AGRADA VALENZUELA

Abancay, Junio del 2018

PERÚ



**UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS
DE APURÍMAC**

FACULTAD DE INGENIERÍA

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL**



**“EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE BIORREMEDIACIÓN DE
AGUA CON METALES PESADOS USANDO BIOMASA DE
BASIDIOMICETOS PROVENIENTES DEL SANTUARIO NACIONAL
DEL AMPAY”**

**TESIS PARA OPTAR TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO
AGROINDUSTRIAL**

YULY AGRADA VALENZUELA

Abancay, Junio del 2018

PERÚ

**“EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE BIORREMEDIACIÓN DE
AGUA CON METALES PESADOS USANDO BIOMASA DE
BASIDIOMICETOS PROVENIENTES DEL SANTUARIO NACIONAL
DEL AMPAY”**



DEDICATORIA

CON TODO MI CARIÑO Y MI AMOR PARA LAS PERSONAS QUE HICIERON TODO EN LA VIDA PARA QUE YO PUDIERA LOGRAR UNO DE MIS SUEÑOS, POR MOTIVARME Y DARME LA MANO CUANDO SENTÍA QUE EL CAMINO SE TERMINABA, A USTEDES POR SIEMPRE MI CORAZÓN Y MI AGRADECIMIENTO INFINITO.

“No te rindas pase lo que pase, digan lo que digan, sientas lo que sientas, así ya no sientas solo sobrevive, y ¡Mátalos a todos! ¡No seas un maldito fracasado!

NoxRecomendable



AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi asesor MSc. Víctor Hugo Sarmiento Casavilca por su apoyo incondicional para la realización de este trabajo y por todo lo aprendido. También desde lo personal por su amistad, sus consejos, por estar siempre que lo necesité, y por creer en mi aun en los momentos en que yo no lo hacía.

A mis padres por su amor y dedicación por sus hijos. A mis queridos hermanos: Einer: por ser nuestro ángel, modelo perfecto de bondad, humildad, honestidad, y esfuerzo. Elvis, Jorge, Sindy, Dafny y Yesi: por todo su apoyo incondicional, consejos en momentos difíciles, por su complicidad y por ser mis confidentes. A ustedes gracias por darme el mejor regalo, mis sobrinos: Sisari, Diogo, Sitwa, Samin, Kira y Sayri, quienes alegran mi vida.

A mis compañeros y amigos, por su apoyo y compañía en este tiempo, quiero expresarles que para mí fue un privilegio conocerlos compartir todas y cada una de las experiencias vividas.

A la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial, por darme los medios para el desarrollo de mi investigación.

A la dirección de investigación de la UNAMBA, por el apoyo económico brindado para culminar mi trabajo de investigación.

UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL

DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

AUTORIDADES UNIVERSITARIAS

DR. ECON. LEONARDO ADOLFO PRADO CÁRDENAS.

RECTOR.

DR. ROLANDO RAMOS OBREGÓN.

VICERECTOR ACADÉMICO.

DRA. IRIS EUFEMIA PAREDES GONZÁLEZ

VICERECTORA DE INVESTIGACIÓN.



UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC
FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL
DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

AUTORIDADES DE FACULTAD

PhD Ing. LUCY MARISOL GUADALUPE GUANICHI ORELLANA.

DECANA DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA.

MSc. GUADALUPE CHAQUILLAQUILCA.

DIRECTORA DE LA ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL.

ING. DARIO DANTE SÁNCHEZ CASTILLO

DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE LA FACULTAD DE
INGENIERÍA.



CONFORMIDAD DE TESIS

El suscrito M.Sc. Víctor Hugo Sarmiento Casavilca docente asociado de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, ASESOR del proyecto de Tesis e informe final denominado “Evaluación de un sistema de biorremediación de agua con metales pesados usando biomasa de basidiomicetos provenientes del Santuario Nacional del Ampay” presentado por la Bach. Yuly Agrada Valenzuela, para optar el Título Profesional de INGENIERO AGROINDUSTRIAL, da conformidad de que el estudio ha sido desarrollado siguiendo el Método Científico, redactado de acuerdo a las normas de estilo APA y el Reglamento General de Grados y Títulos de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, habiéndose subsanado todas las observaciones presentadas por el jurado evaluador.

Abancay Junio del 2018



M.Sc. Víctor Hugo Sarmiento Casavilca

Asesor

UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

TESIS

“EVALUACIÓN DE UN SISTEMA DE BIORREMEDIACIÓN DE AGUA CON
METALES PESADOS USANDO BIOMASA DE BASIDIOMICETOS
PROVENIENTES DEL SANTUARIO NACIONAL DEL AMPAY”

Responsable: YULY AGRADA VALENZUELA



Ing. Luis Ricardo Paredes Quiroz

Presidente del jurado



Ing. Alfredo Fernández Ayma

Primer miembro del jurado



Ing. Ruth Mery Ccopa Flores

Segundo miembro del jurado



M.Sc. Victor Hugo Sarmiento Casavilca

Asesor de tesis

ES COPIA FIEL DEL ORIGINAL



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En el auditorio de Administración (EAP) de la Facultad de Administración de la sede Académica de la UNAMBA, siendo las 11:00 a.m. del día 07 de junio del 2018. El presidente del jurado evaluador Ing. Luis Ricardo Paredes Quiroz dio lectura de memorando multiple N° 080-2018-D-EAP/A UNAMBA, acto seguido invitó al Bach. Yuly Agrada Valenzuela para la sustentación oral y pública de Tesis titulado "Evaluación de un sistema de biorremediación de agua con metales pesados usando biomasa de basidio micetos provenientes del santuario Nacional del Ampay" Solicitado por la bach. para lo cual se concedió un tiempo de 30 minutos reglamentarios. Acto seguido, el presidente evaluador se le invitó a el Ing. Alfredo Fernández Ayma como primer miembro para sus preguntas y observaciones pertinentes, luego al Ing. Ruth Mery Copo Flores como segundo miembro y finalmente al presidente Ing. Luis Ricardo Paredes Quiroz, quienes hicieron observaciones sobre la forma y fondo de la tesis, fueron respondidos las preguntas formuladas por el jurado; al termino del acto el presidente evaluador dejar en privado para la evaluación correspondiente. El jurado evaluador otorga el calificativo de Bueno (15) con el que concluyó el presente acto, siendo las 12:45 AM. en pé de lo actuado firman los integrantes del jurado evaluador y la señanta Tesista.

UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC
 FACULTAD DE ADMINISTRACIÓN
 E.A. ADMINISTRACIÓN INDUSTRIAL

Ing. Alfredo Fernández Ayma
 DOCENTE
 PRIMER MIEMBRO

UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC
 FACULTAD DE ADMINISTRACIÓN
 E.A. ADMINISTRACIÓN INDUSTRIAL

Ing. Luis Ricardo Paredes Quiroz
 PRESIDENTE

UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC
 FACULTAD DE ADMINISTRACIÓN
 E.A. ADMINISTRACIÓN INDUSTRIAL

Ing. Ruth Mery Copo Flores
 DOCENTE
 SEGUNDO MIEMBRO

Con el presente documento
 se copia el original que obra en
 Los archivos de esta institución a los
 que se remite en caso necesario.
 20 JUN 2018

Sustentante

UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC
 Ing. M.Sc. Víctor Hugo Gamalindo Cervantes
 DOCENTE
 ASESOR

UNIVERSIDAD NACIONAL MICAELA BASTIDAS DE APURÍMAC

Abog. Frank Encinas Orbegosa



ÍNDICE GENERAL

	PÁG
RESUMEN..	9
ABSTRACT	10
CAPÍTULO I	11
INTRODUCCIÓN	11
CAPÍTULO II	14
MARCO TEÓRICO	14
2.1. LA MINERÍA.....	14
2.2. CONTAMINACIÓN MINERA.....	14
2.3. PROBLEMÁTICA DE LOS RESIDUOS DE LA MINERÍA EN EL PERÚ.....	15
2.4. CONTAMINACIÓN DEL AGUA POR METALES PESADOS Y SU REPERCUSIÓN EN EL MEDIO AMBIENTE Y SALUD.....	16
2.5. METALES PESADOS.....	18
2.5.1. COBRE (Cu).....	19
2.5.2. PLOMO (Pb).....	19
2.5.3. CADMIO (Cd).....	20
2.6. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS	20
2.6.1. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA (EAA).....	21
2.6.1.1. PRINCIPIO DEL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS.....	21
2.6.1.2. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE METALES PESADOS.....	21
2.7. BASIDIOMICETOS	22
2.7.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES.....	22
2.7.2. BASIDIOMICETOS Y SU IDENTIFICACIÓN	23
2.7.2.1. MICELIO.....	23
2.7.2.2. BASIDIOCARPO.....	24
2.8. CLASIFICACIÓN	25
2.9. CEPAS	26
2.9.1. CEPARIO	26
2.9.2. AISLAMIENTO Y MANTENIMIENTO DE CEPAS.....	26
2.9.2.1. MEDIOS DE CULTIVO	26

2.9.2.2.	CONSERVACIÓN DE CEPAS	26
2.10.	LA BIOMASA	28
2.11.	BIORREMEDIACIÓN	28
2.12.	BASIDIOMICETOS COMO AGENTES BIORREMEDIADORES DE METALES PESADOS.....	29
2.12.1.	MECANISMO DE BIORREMEDIACIÓN DE LA BIOMASA DE BASIDIOMICETOS.....	30
2.12.1.1.	BIOSORCIÓN	30
2.13.	COLUMNA DE LECHO EMPACADO	35
2.13.1.	LECHO EMPACADO.....	35
2.13.2.	CINÉTICA DE ADSORCIÓN	35
2.13.3.	DINÁMICA DE SORCIÓN EN COLUMNA EMPACADA DE LECHO FIJO.....	36
CAPÍTULO III.....		38
MATERIALES Y MÉTODOS		38
3.1.	UBICACIÓN ESPACIO-TEMPORAL	38
3.2.	MATERIALES.....	38
3.2.1.	CEPAS DE HONGOS BASIDIOMICETOS	38
3.2.2.	EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS	38
3.3.	MÉTODOS.....	40
3.3.1.	TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN	40
3.3.2.	DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	40
3.3.3.	POBLACIÓN.....	40
3.3.4.	MUESTRA	40
3.4.	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	41
3.4.1.	ETAPA I: OBTENCIÓN DE LA BIOMASA A PARTIR DE CEPAS DE BASIDIOMICETOS	41
3.4.1.1.	COLECTA DE HONGOS BASIDIOMICETOS	42
3.4.1.2.	AISLAMIENTO DE CEPAS	42
3.4.1.3.	REPIQUE.....	45
3.4.1.4.	INOCULADO.....	46
3.4.1.5.	OBTENCIÓN DE LA BIOMASA	46
3.4.1.6.	EVALUACIÓN DE LA BIOMASA EN ESPECTROFOTOMETRIA INFRAROJO (FTIR).....	47

3.4.2.	ETAPA II: ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA	48
3.4.2.1.	EMPAQUETADO	48
3.4.2.2.	PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN PATRON MULTIELEMENTAL	48
3.4.3.	ETAPA III: EVALUACIÓN	49
3.4.3.1.	FILTRACIÓN EN COLUMNA DE LECHO POROSO.....	49
CAPÍTULO IV		51
RESULTADOS Y DISCUSIONES		51
4.1.	RESULTADOS DE LA ETAPA I.....	51
4.1.1.	COLECTA Y AISLAMIENTO DE HONGOS BASIDIOMICETOS PARA LA OBTENCIÓN DE BIOMASA	51
4.1.2.	OBTENCIÓN DE BIOMASA.....	52
4.2.	RESULTADOS DE LA ETAPA II	53
4.2.1.	ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA	53
4.3.	RESULTADOS DE LA ETAPA III.....	54
4.3.1.	EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DEL SISTEMA DE BIORREDACIÓN PARA METALES PESADOS Y PARA CADA HONGO.....	54
4.3.2.	CINÉTICA DE RETENCIÓN DE METALES POR CADA TIPO DE HONGO.....	57
4.4.	CAUDAL DE LA SOLUCIÓN DE METALES PESADOS	63
4.5.	RELACIÓN ENTRE EL PESO DE LA BIOMASA MUERTA Y EL VOLUMEN DE SOLUCIÓN MULTIMETAL BIORREMEIDIADA.....	64
CAPÍTULO V		66
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		66
5.1.	CONCLUSIONES	66
5.2.	RECOMENDACIONES	67
BIBLIOGRAFÍA		68
ANEXOS.....		74

ÍNDICE CUADROS

	PÁG
CUADRO 1: Denominación y codificación de las cepas.....	42
CUADRO 2: Longitud de onda para cada metal.....	50
CUADRO 3: Coordenadas geográficas Santuario Nacional del Ampay: Laguna Ankas Q´ocha (laguna pequeña).....	51
CUADRO 4: Identificación de basidiomicetos y cepas	52
CUADRO 5: Producción de biomasa a las 96 horas	53
CUADRO 6: Pesos de biomasa seca para el empaquetado de columnas	54
CUADRO 7: Resultados estadísticos de anova y tukey para los sistemas de biorremediación evaluados	55
CUADRO 8: Caudal de la alimentación de la solución de metales pesados.....	63
CUADRO 9: Relación peso de biomasa y el volumen del metal para la biorremediación.....	65

ÍNDICE DE TABLAS

PÁG

TABLA 1:	Límites máximos permisibles de concentración de metales pesados (Hg, As, Cd y Pb) en agua, suelo y alimentos de consumo humano.....	17
TABLA 2:	Límites máximos permisibles para la descarga de efluentes líquidos de actividades minero - metalúrgicos.....	17
TABLA 3:	Metales pesados y valores de interés según los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para el agua.....	18
TABLA 4:	Afinidad de grupos funcionales e iones metálicos	31
TABLA 5:	Capacidad de biosorción (mmol/g) de diferentes tipos de biomásas.....	35

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁG
FIGURA 1: Partes del basidiomiceto.....	23
FIGURA 2: Esquema general de los mecanismos del proceso de adsorción en columna de lecho fijo.....	33
FIGURA 3: Esquema de una columna de lecho fijo.....	37
FIGURA 4: Etapas de la metodología experimental.....	41
FIGURA 5: Diagrama de flujo para el aislamiento de cepas.....	43
FIGURA 6: Aislado de cepas.....	44
FIGURA 7: Repique de la cepa	45
FIGURA 8: Inoculado.....	46
FIGURA 9: Diagrama de flujo para la obtención de biomasa	47
FIGURA 10: Sistema de filtración por lecho poroso acondicionado para la biorremediación de agua con metales pesados.....	49

ÍNDICE DE GRÁFICOS

	PÁG
GRÁFICO 1: Retención de metales por cada tipo de basidiomicetos.....	56
GRÁFICO 2: Evaluación de retención en función de cada metal y basidiomiceto	56
GRÁFICO 3: Cinética deretención de cobre para cada biomasa de basidiomicetos.....	57
GRÁFICO 4: Cinética retención de plomo por cada biomasa de basidiomicetos.	58
GRÁFICO 5: Cinética de retención de cadmio por cada biomasa de basidiomicetos.	58
GRÁFICO 6: Cinética de retención de metales por la biomasa del basidiomiceto geastrum. ..	59
GRÁFICO 7: Cinética de retención de metales por la biomasa del basidiomiceto hygrophorus.	59
GRÁFICO 8: Cinética deretención de metales por la biomasa del basidiomiceto cantharellus.	60
GRÁFICO 9: Cinética deretención de metales por la biomasa del basidiomiceto ectomicorriza	60

RESUMEN

Con el desarrollo de las actividades industriales, los problemas de contaminación ambiental aumentaron debido a la presencia de contaminantes peligrosos, ante ello se ha demostrado en diversas investigaciones la capacidad de los microorganismos para la remoción de metales tóxicos (biorremediación) siendo menos costoso y menos dañino para el medio ambiente. El presente estudio logró desarrollar un sistema de biorremediación de metales pesados utilizando biomasa de basidiomicetos provenientes del Santuario Nacional del Ampay para retener metales como el plomo, cadmio y cobre. Se realizó a nivel de laboratorio el empaquetamiento en columnas de lecho poroso con biomasa seca de 4 basidiomicetos pertenecientes a los géneros *Geastrum*, *Hygrophorus*, *Cantharellus* y *Ectomicorriza* obteniéndose 4.34 ± 0.235 g/L, 5.50 ± 0.342 g/L, 3.64 ± 0.129 g/Ly 3.45 ± 0.754 g/L en producción de biomasa respectivamente, a las 96 horas de inoculado en caldo Saboraud dextrosa. La máxima capacidad de biorrediación corresponde a la biomasa del basidiomiceto de género *Cantharellus*, quien retuvo un porcentaje de 100 ± 0.049 de cobre, 100 ± 0.051 de plomo y 100 ± 1.197 de cadmio, seguido del basidiomiceto del género *Ectomicorriza* que retuvo $56.56 \pm 0.017\%$ de cobre, $100.53 \pm 0.005 \%$ de plomo y $87.53 \pm 0.005 \%$ de cadmio, así mismo el género de *Hygrophorus* permitió una capacidad de retención de $65.41 \pm 0.012 \%$ de cobre, $74.79 \pm 0.004 \%$ de plomo y $41.29 \pm 0.08 \%$ de cadmio, por último el género *Geastrum* retuvo $0.63 \pm 0.60 \%$, plomo $69.41 \pm 0.001 \%$ y cadmio de $1.65 \pm 0.071 \%$.

ABSTRACT

With the development of industrial activities, the problems of environmental pollution increased due to the presence of dangerous pollutants, before it has been demonstrated in various investigations the capacity of microorganisms for the removal of toxic metals (bioremediation) being less expensive and less harmful For the enviroment. The present study was able to develop a system of bioremediation of heavy metals using biomass of basidiomycetes from the National Sanctuary of Ampay to retain metals such as lead, cadmium and copper. The packing in columns of porous bed with dry biomass of 4 basidiomycetes belonging to the genera Geastrum, Hygrophorus, Cantharellus and Ectomycorrhiza was obtained, obtaining 4.34 ± 0.235 g / L, 5.50 ± 0.342 g / L, 3.64 ± 0.129 g / L L and 3.45 ± 0.754 g / L in biomass production respectively, at 96 hours of inoculation in Saboraud dextrose broth. The maximum capacity of biorrediación corresponds to the biomass of the basidiomycete of genus Cantharellus, who retained a percentage of 100 ± 0.049 of copper, 100 ± 0.051 of lead and 100 ± 1.197 of cadmium, followed by the basidiomycete of the genus Ectomycorrhiza that retained $56.56 \pm 0.017\%$ of copper, $100.53 \pm 0.005\%$ of lead and $87.53 \pm 0.005\%$ of cadmium, likewise the genus of Hygrophorus allowed a retention capacity of $65.41 \pm 0.012\%$ copper, $74.79 \pm 0.004\%$ lead and $41.29 \pm 0.08\%$ cadmium, finally the genus Geastrum retained $0.63 \pm 0.60\%$, lead $69.41 \pm 0.001\%$ and cadmium of $1.65 \pm 0.071\%$.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La contaminación en la actualidad es uno de los problemas ambientales más importantes debido a la mayor presencia de actividades productivas como es la minería. La región de Apurímac es una de las más pobres y pequeñas del Perú, sin embargo, es una zona eminentemente minera contando con los 3 proyectos más costosos de la historia, (Las Bambas, Apurímac Ferrum, Los Chancas)(MEM, 2016). Este hecho es beneficioso para la economía, pero es preocupante para el medio ambiente, debido que las industrias mineras son una de las principales fuentes de generación de metales pesados y sustancias tóxicas los que son vertidos a los yacimientos hídricos sin un tratamiento adecuado previo. Los iones metálicos pesados como Arsénico (As), Cadmio (Cd), Cobalto (Co), Cromo (Cr), Cobre (Cu), Mercurio (Hg), Níquel (Ni), Plomo (Pb), Estaño (Sn) o Zinc (Zn) en cantidades excesivas a las permitidas, tiene repercusiones negativas en la salud del ser humano cuya exposición está relacionada con problemas de salud como: retrasos en el desarrollo cognitivo, varios tipos de cáncer, daños en los riñones, e incluso la muerte. Pueden cambiar la alcalinidad del suelo y disminuir su productividad, producir algunas alteraciones en las plantas, a nivel de los ríos y lagos, también afecta principalmente la fauna (Londoño & Muñoz, y Reyes, Vergara, Díaz, & Gonzáles, 2016).

Actualmente existen diferentes procesos de remediación para la eliminación de metales pesados de soluciones acuosa como la precipitación química y la sorción (métodos tradicionalmente más empleados) (Dávila , 2012), pero dan soluciones parciales al problema, son caras o generan subproductos tóxicos, lo que afecta al medio ambiente. Por lo tanto, la

necesidad de buscar métodos ambientalmente seguros motiva el interés hacia las técnicas biológicas (Batul, 2017). El uso de biomasa proveniente de hongos es utilizado como biosorbente debido a su gran cantidad de compuestos orgánicos los cuales son capaces de adsorber y/o intercambiar iones metálicos gracias a sus grupos funcionales (aminos, hidroxilos, carboxilos, etc.) que actúan como centros atrayentes de cationes. Además son de bajo costo, tienen cierta selectividad por los metales y son de fácil manejo (Cañizares, 2000).

Por ello se tiene como alternativa, evaluar un sistema de columnas con lecho poroso, con biomasa de basidiomicetos provenientes del Santuario Nacional del Ampay, como un método para determinar el desempeño de biorremediación de metales pesados (cobre, plomo y cadmio) en una solución acuosa. Siendo necesaria la obtención de biomasa, que será sometida a secado, triturado y empacado en columnas con un flujo de una solución de agua con metales pesados. Posteriormente se analizará la concentración del efluente de la columna utilizando el equipo de Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA); La identificación de los hongos basidiomicetos, así como la identificación de los grupos funcionales presentes en las biomasas y el estudio de los factores que afectan el proceso de biosorción como son el pH tiempo de contacto, los que deben ser investigados.

❖ **OBJETIVOS**

○ **OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar un sistema de Biorremediación de agua con metales pesados, utilizando biomasa de cuatro basidiomicetos provenientes del Santuario Nacional del Ampay.

○ **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Desarrollar a nivel de laboratorio un sistema de empaquetamiento de columnas de lecho poroso con biomasa de cuatro basidiomicetos provenientes del Santuario Nacional del Ampay, para la biorremediación de agua con metales pesados.
- Evaluar el desempeño de la biomasa de cuatro tipos de basidiomicetos provenientes del Santuario Nacional del Ampay como agentes biorremediadores de agua con metales pesados.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. LA MINERÍA

La minería es una de las actividades más antiguas de la humanidad, que consiste en la obtención selectiva de minerales y otros materiales a partir de la corteza terrestre (MME, 2015).

La minería en el Perú a lo largo de la historia, ha sido uno de los principales motores de la economía y uno de los argumentos más poderosos de nuestra riqueza. De acuerdo con el Ministerio de Energía y Minas (MEM), a nivel mundial y latinoamericano, el Perú se ubica entre los primeros productores de oro, plata, cobre, plomo, zinc, hierro, estaño, molibdeno, entre otros(Loayza, 2016).

Entre las regiones que tienen el mayor número de proyectos mineros se encuentra Apurímac, una de las regiones más pobres y pequeñas del país el cual tiene 3 de los proyectos más costosos de la historia(MEM, 2016). A pesar de ello, la actividad minera es también el origen de muchos desencuentros e inequidades sociales, que han cobrado fuerza en las últimas décadas, y de daños significativos al ambiente(Loayza, 2016).

2.2. CONTAMINACIÓN MINERA

Las fuentes principales de contaminación del agua son por vertimientos urbanos, industriales, mineros, y agrícolas (Ocola, 2015).

La minería ha tenido graves implicaciones medioambientales pues desplazan comunidades, se apropian de extensos territorios, de las aguas, de la biodiversidad , desequilibran la seguridad

y soberanía alimentaria de la población afectada(Coello & Burgos, 2012). Produce un impacto directo en el suelo, flora, fauna y el agua. En la fase de prospección y exploración, se abren caminos, se derriban bosques primarios, intervienen maquinarias utilizando combustibles contaminantes. En la explotación se utilizan metales pesados y otras sustancias tóxicas, entre ellos: Hierro, Cobre, Zinc, Mercurio, Plomo, Arsénico, Cianuro, etc, que directamente se depositan en los yacimientos hídricos(Ocola, 2015).

2.3. PROBLEMÁTICA DE LOS RESIDUOS DE LA MINERÍA EN EL PERÚ

En el Perú la contaminación de las aguas es tan antigua como el desarrollo de las ciudades, las industrias mineras que se desarrollan en nuestras cordilleras a alturas que varían de 4,000 a 5,000 msnm, casi en el nacimiento de los cursos de aguas superficiales que forman riachuelos, y a su vez forman ríos que desembocan al mar. El proceso técnico de obtención de minerales envuelve una serie de procedimientos empleando una serie de reactivos químicos que actuando como decantadores obtienen el mineral puro en forma de concentrado. Los líquidos resultantes de este proceso conteniendo a veces excedentes de reactivos químicos o iones metálicos, como cobre, plomo, plata que por algunas circunstancias no son obtenidos por estos procedimientos químicos salen a depositarse algunas veces en lo que se denominan canchas de relaves, donde por decantación los sólidos son retenidos y el efluente líquido discurre a lo largo de las quebradas, cayendo finalmente a algún curso del agua (Malnati, 2000).

2.4. CONTAMINACIÓN DEL AGUA POR METALES PESADOS Y SU REPERCUSIÓN EN EL MEDIO AMBIENTE Y SALUD

Los recursos hídricos se encuentran entre los más amenazados y afectados por la actividad minera y metalúrgica, generalmente causados por deficiente planificación y evaluación previa, inadecuadas técnicas de las operaciones y del tratamiento de minerales y desechos lo que produce daños a la integridad y funcionamiento de los ecosistemas y a la salud de las personas. Esto puede ocurrir de forma directa, a través del vertido en ríos, lagunas y ambientes marino costeros de efluentes que superan los límites máximos permisibles de metales tóxicos establecidos por la normativa peruana (tabla 2) e internacional, y de manera indirecta, por deposición de polvo y partículas, que adsorben cationes metálicos, en ecosistemas acuáticos (Loayza, 2016).

Los metales pesados tienden a bioacumularse (biomagnificarse), y aumenta la concentración de un producto químico en un organismo biológico en un cierto plazo. Como elementos de rastro, algunos metales pesados (cobre, selenio, zinc) son esenciales mantener en el metabolismo del cuerpo humano por que realizan funciones indispensables para el mantenimiento de la vida, el crecimiento y la reproducción. Sin embargo, en concentraciones más altas pueden conducir al envenenamiento (Coello & Burgos, 2012).

Los más susceptibles de estar presentes en el agua de consumo humano son el mercurio, níquel, cobre, plomo y cromo, aunque también pueden aparecer otros como el hierro, arsénico, cadmio, etc. (Vigo, 2017).

Tabla 1: Límites máximos permisibles de concentración de metales pesados (Hg, As, Cd y Pb) en agua, suelo y alimentos de consumo humano

Alimento	Unidad	Hg	As	Cd	Pb
Agua de consumo humano		0.001	0.05	0.01	0.05
Agua marina y de estuarios	mg/L (ppm)	0.0001	0.05	0.05	0.01
Agua de uso agrícola		0.001	0.1	0.01	0.05
Agua para uso pecuario		0.01	0.2	0.05	0.05

Fuente: Codex, 1995 y UE (2016) mencionado por Reyes, Vergara, Díaz, & Gonzáles (2016)

Tabla 2: Límites máximos permisibles para la descarga de efluentes líquidos de actividades minero - metalúrgicos

Parámetro	Unidad	Límite en cualquier momento	Límite para el promedio anual
pH		6 - 9	6-9
Sólidos totales en suspensión		50	25
Aceites y grasas		20	16
Cianuro total		1	0.8
Arsénico total		0.1	0.08
Cadmio total	mg/L o (ppm)	0.05	0.04
Cromo Hexavelente (*)		0.1	0.08
Cobre total		0.5	0.4
Hierro (Disuelto)		2	1.6
Plomo total		0.02	0.16
Mercurio total		0.002	0.0016
Zinc total		1.5	1.2

Fuente: MINAM(2010)

(*) En muestra no filtrada

Los valores indicados en la columna “Límite en cualquier momento” son aplicables a cualquier muestra colectada por el Titular Minero, el Ente Fiscalizador o la Autoridad Competente.

Tabla 3: Metales pesados y valores de interés según los estándares de calidad ambiental (ECA) para el agua

Metal pesado	Unidad	A1	A2	A3
Cadmio (Cd)	mg/L	0.003	0.005	0.01
Cobre (Cu)		2	2	2
Plomo (Pb)		0.01	0.05	0.05

Fuente: D.S. N°004-2017-MINAM

A1: aguas que pueden ser potabilizadas con desinfección: aquellas aguas que pueden ser destinadas para el consumo humano por simple desinfección.

A2: aguas que pueden ser potabilizadas con tratamiento convencional: aquellas aguas para consumo humano, sometidas a un tratamiento convencional, mediante dos o más de los siguientes procesos: coagulación, floculación, decantación, sedimentación, y/o filtración otros.

A3: aguas que pueden ser potabilizadas con tratamiento avanzado: agua para consumo humano, sometidas a un tratamiento convencional que incluye procesos físicos y químicos avanzados como percolación, micro filtración, ultrafiltración, nanofiltración, carbón activado, ósmosis inversa, otros.

2.5. METALES PESADOS

Según la tabla periódica un metal pesado es un elemento químico con alta densidad (mayor a 4 g/cm^3), masa y peso atómico por encima de 20. Algunos de estos elementos son: Aluminio (Al), Bario (Ba), Berilio (Be), Cobalto(Co), Cobre (Cu), Estaño(Sn), Hierro (Fe), Manganeseo (Mn), Cadmio (Cd), Mercurio (Hg), Plomo (Pb), Arsénico (As), Cromo (Cr), Molibdeno (Mo), Níquel (Ni), Plata (Ag), Selenio (Se), Talio (Tl), Vanadio (Va), Oro (Au) y Zinc (Zn)(Londoño & Muñoz, 2016).

Muchos de ellos son esenciales para el crecimiento y desarrollo de plantas, animales y seres humanos (Mendoza, 2017), sin embargo en algunos casos su deficiencia o exceso puede conducir a problemas de salud(Londoño & Muñoz, 2016).

Los metales son elementos que muchas veces no se degradan totalmente (Mendoza, 2017) y son bioacumulativos, ya que se acumulan en el medio ambiente y el organismo, y no se eliminan ni por heces, ni por sudoración ni por orina(Vigo, 2017).

2.5.1. COBRE (Cu)

Metal de transición de color rojizo que junto con la Plata y el Oro forman la llamada familia del cobre (Lara, 2008) y de número atómico 29, posee buenas propiedades químicas, eléctricas, físicas y mecánicas además de su abundancia por lo que tiene una gran variedad de aplicaciones técnicas tanto puro como en las aleaciones(Londoño & Muñoz, 2016).

La exposición prolongada a polvos de cobre puede irritar la nariz, la boca, los ojos y causar dolores de cabeza, mareo, náusea y diarrea; El beber agua en concentraciones altas de cobre produce náusea, vómitos, calambres estomacales o diarrea, además puede causar daño del hígado y los riñones y la muerte. La EPA no ha clasificado al cobre en cuanto carcinogenicidad en seres humanos porque no hay estudios adecuados en seres humanos o en animales(ATSDR, 2016).

2.5.2. PLOMO (Pb)

Metal pesado de color azulado que se ha utilizado durante muchos años debido a su resistencia a la corrosión, ductibilidad, maleabilidad y facilidad para formar aleaciones. Su número atómico es 82, peso atómico 207 (Londoño & Muñoz, 2016) y sus valencias químicas normales son 2 y 4.(Lara, 2008).

Es uno de los metales pesados más tóxicos gran capacidad de bioacumulación (Sánchez C. , 2016). Las vías principales de contaminación en los humanos son a través de la respiración y los alimentos (sólidos y líquidos). La intoxicación causa el "saturnismo" o "plumbismo" que provoca anemia, afecta el sistema nervioso central, puede generar alteraciones digestivas (Castillo, 2015).El plomo no se degrada. Cuando se libera al aire puede ser transportado largas distancias antes de sedimentar(Sánchez C. , 2016).

2.5.3. CADMIO (Cd)

Metal pesado blanco azulado, elemento poco abundante en la naturaleza que se obtiene como subproducto de la minería y de la extracción de zinc y de plomo. Es uno de los contaminantes metálicos de los alimentos más peligrosos debido no solo a su elevada toxicidad y capacidad de acumulación en la cadena alimentaria sino también a su amplia distribución derivada de sus numerosas aplicaciones industriales(Graza, 2015).

En cuanto a los daños al ambiente, entra al aire de fuentes como la minería, industrias y al quemar carbón y desechos. Las partículas pueden viajar largas distancias y depositarse en el suelo o agua(Sánchez C. , 2016).

2.6. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS

En la actualidad existen muchos métodos para el análisis de metales pesados en aguas. Sin embargo, uno de los más utilizados actualmente es la Espectrofotometría de Absorción Atómica.

2.6.1. ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA (EAA)

La Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) es una técnica analítica para la determinación cuantitativa o cualitativa de un elemento en una muestra. Está basada en la absorción de radiación de energía por átomos libres(Sánchez C. , 2016), el término espectrofotometría significa la observación y el estudio del espectro, o registro que se tiene de una especie tal como una molécula, un ion o un átomo, cuando estas especies son excitadas por alguna fuente de energía que sea apropiada para el caso (Rocha, 2000).

La velocidad y facilidad a la cual puede hacerse una determinación precisa y exacta con esta técnica, hace que la absorción atómica sea uno de los métodos más populares para la determinación de metales(Sánchez C. , 2016).

2.6.1.1. PRINCIPIO DEL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS

Según la norma mexicana (Norma Oficial Mexicana, 2001) el método para la determinación de metales por espectrofotometría de absorción atómica en aguas naturales, potables y residuales se basa en la generación de átomos en estado basal y en la medición de la cantidad de energía absorbida por estos, la cual es directamente proporcional a la concentración de ese elemento en la muestra analizada. La EAA con flama es el método más empleado para la determinación de metales, la solución muestra es directamente aspirada a una llama de flujo laminar(Razmilic, 2016).

2.6.1.2. ANÁLISIS CUANTITATIVO DE METALES PESADOS

Cuando la absorbancia de soluciones estándar de concentración conocida del elemento a determinar se grafica vs. la concentración, se obtiene una curva de

calibración. La curva así obtenida es generalmente lineal a bajas concentraciones y la concentración de la muestra puede ser determinada por interpolación de su absorbancia en la curva de calibración. Para emplear este método de análisis cuantitativo las composiciones de las soluciones estándar deben ser preparadas lo más semejante posible a la composición de la solución muestra para compensar o eliminar interferencias (Raszmiliz, 2016).

Como la cantidad de energía que se pone en la llama es conocida, y la cantidad restante en el otro lado (el detector) se puede medir, es posible, a partir de la ley de Beer-Lambert, calcular cuántas de estas transiciones tiene lugar, y así obtener una señal que es proporcional a la concentración del elemento que se mide (Graza, 2015).

2.7. BASIDIOMICETOS

2.7.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Los basidiomicetos (basidiomycota) son una división del reino Fungi (Villamizar & Caycedo, 2013). Los basidiomicetos constituyen un grupo de hongos con más de 31, 000 especies vivas, en los que se encuentran las clásicas setas y hongos con sombrero. La característica más notable del grupo es una estructura en forma de palo, el basidio, en el que se producen las meiosporas (basidiosporas) (Taylor, Krings, & Taylor, 2015).

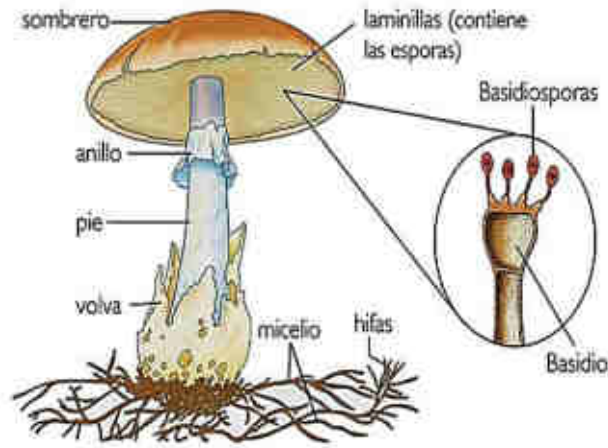


Figura 1: Partes del basidiomiceto

Fuente: Villamizar & Caycedo (2013)

2.7.2. BASIDIOMICETOS Y SU IDENTIFICACIÓN

Una forma de identificar a los hongos es de acuerdo a la observación de características en su micelio (hifas) y cuerpos (Courtecuisse & Duhem, 2000).

2.7.2.1. MICELIO

El micelio está formado por hifas bien desarrolladas, septadas, que constituye el cuerpo vegetativo del hongo. Dependiendo de su crecimiento se clasifican en reproductores (aéreos) o vegetativos. Los micelios reproductores crecen hacia la superficie externa del medio y son los encargados de formar los argánulos reproductores para la formación de nuevos micelios y los micelios vegetativos se encargan de la absorción de nutrientes, crecen hacia abajo, para cumplir su función; son microscópicas (Villamizar & Caycedo, 2013; Asturnatura, 2016).

El micelio del hongo, bajo condiciones adecuadas de temperatura, luz y humedad, produce el cuerpo fructífero o carpóforo, conocido comúnmente como seta (Reyes et al. 2009 citado en Palacios, 2016).

2.7.2.2. BASIDIOCARPO

Un basidiocarpo es el cuerpo fructífero de un basidiomiceto, que consiste en una estructura multicelular (Villamizar & Caycedo, 2013). Las setas, las clavarias o manitas, las estrellas de tierra son casos de hongos con basidiocarpos (Dennis 1970, Alexopoulos & Mims 1996 citado en Palacios, 2016). Según Villamizar & Caycedo (2013) al igual que ocurre con los esporangios, los basidiomicetos que son visibles al ojo desnudo son comúnmente denominados como hongos, mientras que los basidiocarpos que se sitúan bajo tierra son denominados falsas trufas.

Los cuerpos fructíferos según Courtecuisse y Duhem (2000) se caracterizan por presentar:

Sombrero: Es la parte ensanchada de la seta, en el extremo superior. Las formas del sombrero son muy variables.

Cutícula: Es la piel o membrana fina que recubre toda la porción superior del sombrero, puede ser lisa, aterciopelada o viscosa, o estar agrietada

Himenio: Situado en la parte inferior del sombrero en que se forman las esporas y una de las partes donde se encuentra la mayor de la información macro y microscópica. Pueden ser láminas, poros, pliegues, aguijones.

Estípite o pie: equivalente al tronco de un árbol en su función de elevar, nutrir y sostener la ramificación reproductora, en este caso el sombrero con el himen.

Así mismo una forma de caracterizar a los basidiomicetos es según criterios morfológicos como son por el tamaño, color, textura, translucidez, características de borde, otros(Pacheco & Serpas, 2013).

2.8. CLASIFICACIÓN

- **Pucciniomycetes:** Incluye unas 1000 especies divididas en 63 géneros. Usualmente patógenos de plantas (Villamizar & Caycedo, 2013). Se compone de un grupo diverso de hongos altos, tales como royas, levaduras, hongos de la suciedad, y de la jalea(Brondz, 2014).
- **Agaricomycotina:** Están dentro de este grupo los hongos de jalea, levaduras, champiñones, son de orden: Agaricales el cual consta de 32 familias, más de 400 géneros(Brondz, 2014).
- **Ustilaginomycetes:** Son una clase de hongos (tizones o carbones). Incluye unas 1.400 especies divididas en 70 géneros. Usualmente parásitos de gramíneas (Poaceae) (Villamizar & Caycedo, 2013).
- **Hymenomycetes:** Dentro de esta clase se incluyen varios géneros de hongos causantes de enfermedades de especies forestales, frutales y algunas ornamentales. Los cuerpos fructíferos son generalmente sombrillas. Orejas de palo y otras formas visibles a simple vista (Villamizar & Caycedo, 2013).

2.9. CEPAS

Se denomina cepa, al micelio de un hongo (forma algodonosa) que se desarrolla sobre un medio de cultivo nutritivo. Su aislamiento o propagación se puede realizar por medio de espora o del tejido (fragmento del hongo) (Gaitán, Salmones, Pérez , & Mata, 2006), siendo ésta la más común debido al interés en la conservación de sus cualidades definatorias(Iquimicas, 2012).

2.9.1. CEPARIO

El cepario es un muestrario inventariado de microorganismos tales como hongos, bacterias, virus y parásitos que permite la conservación de cepas puras de los mismos(Angel Alarcon, 2006).

2.9.2. AISLAMIENTO Y MANTENIMIENTO DE CEPAS

2.9.2.1. MEDIOS DE CULTIVO

Agar Extracto de Malta (AEM); Agar Papa Dextrosa (APD), ambos frecuentemente utilizados para la obtención de micelio. (Carrillo, 2003; Gaitán, et al, 2006; Malvárez, et al, 2001mencionado en Dominguez, Vázquez, Reyes, Arzaluz, & Martínez, 2013)

2.9.2.2. CONSERVACIÓN DE CEPAS

Organismos internacionales muy reconocidos como son: American Type Culture Collection (ATCC) – Estados Unidos, Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)- España, United States Pharmacopoeia (USP)- Estados Unidos, cuentan con protocolos de calidad y/o procedimientos estandarizados para mejores prácticas en el laboratorio en cuanto al mantenimiento de cultivos microbianos, estos procedimientos han sido

utilizados de guía desde hace décadas para la mayoría de investigaciones en el resto del mundo. Dentro de estos se tiene distintos métodos de conservación, uno de los más utilizados por ser económica es la conservación por transferencia periódica.

➤ **Método de conservación por transferencia periódica.**

Para mantener la viabilidad y evitar la pérdida de las características propias de las cepas, es necesario preservarlas adecuadamente. Para ello la cepa microbiana se guarda en forma de cultivo activo en el medio en el que ha crecido (Dominguez, Vázquez, Reyes, Arzaluz, & Martínez, 2013). Estos cultivos deben ser manejados con cuidado en todo momento para evitar su contaminación.

Las células no pueden permanecer indefinidamente en el mismo tubo, porque al seguir activas excretan productos tóxicos del metabolismo que se acumulan, provocando el envejecimiento y muerte celulares, por lo que es necesario propagar el micelio transfiriendo el cultivo a un medio de cultivo nutritivo y fresco en tubos de ensayo a intervalos que aseguren la viabilidad del mismo. Estos intervalos varían dependiendo de las características del microorganismo en cuestión, algunas especies requieren ser transferidas a nuevos medios después de días o semanas, y otras después de meses o años. Esta frecuencia puede reducirse con el almacenamiento del subcultivo a temperaturas relativamente bajas, en un refrigerador entre 4°C-8°C o en un freezer entre -10°C y -20°C (Snell J, 2001; Merck E, 2000, mencionado por Hernandez & Loiza, 2014), hasta su uso. Se procede a su resiembra o reislamiento cada 4 meses aproximadamente (Dominguez et al., 2013). hasta un máximo de 5 pases. (Uruburu & García, 2012)

2.10. LA BIOMASA

La biomasa es definida como la cantidad de material orgánico, de origen vegetal o animal (Rico, 2007) y cuya obtención más utilizada en medio líquido se realiza mediante la fermentación sumergida (FS) con una porción del tejido del micelio en frascos conteniendo un medio de crecimiento, las que son incubadas en zarandas orbitales en agitación constante y a cierta temperatura, la separación de la biomasa se realiza por filtración o centrifugación, y posteriormente son secadas (Rodríguez, Crescencia, Soria, Aguilera, & Serrat, 2016 & García, Campos, Cruz, Calderón, Raynal, & Buitrón, 2016).

Durante la etapa de crecimiento en FS se observa la formación de masas miceliales compactas de color blanco en forma de pellets, favoreciéndose la transparencia del medio de cultivo. Ésta forma de desarrollo del micelio facilita el empleo del sobrenadante del cultivo en procesos de purificación de enzimas, extracción de exopolisacáridos u otros fines biotecnológicos (Rodríguez et al., 2016).

2.11. BIORREMEDIACIÓN

La biorremediación es una tecnología emergente que consiste en la recuperación del medio ambiente mediante el uso de métodos biotecnológicos (MECD-España, 2016), éstos métodos utilizan organismos (como bacterias, plantas, hongos, etc.) o productos metabólicos obtenidos a partir de ellos para absorber, degradar contaminantes orgánicos peligrosos o convertir contaminantes inorgánicos en compuestos ambientalmente menos o no tóxicos (Sora, 2016). De esta manera atenuar el impacto en el suelo, agua y aire, generado por actividades humanas, agrícolas, mineras y petrolíferas, entre otras (Elsemiarido, 2016).

2.12. BASIDIOMICETOS COMO AGENTES BIORREMEDIADORES DE METALES PESADOS.

Los basidiomicetos habitan una extensa gama de nichos ecológicos, desempeñando papeles valiosos en el ecosistema (Mattos, 2016), uno de ellos es su potencial en procesos de biodegradación y biorremediación, gracias a la capacidad de su sistema ligninolítico para degradar una amplia gama de compuestos xenobióticos (Bakatula, Cukrowska, Weiersbye, Cozmata, Peter & Tutu, 2014). El desarrollo de técnicas de biorremediación con hongos se debe a que éstos presentan enzimas oxidativas y, más específicamente, en las enzimas ligninolíticas. Estas enzimas son capaces de degradar e incluso mineralizar parcialmente sustancias tóxicas y recalcitrantes, tales como tintes textiles, disruptores, hidrocarburos poliaromáticos (HAP), metales pesados encontrados frecuentemente en aguas residuales o en suelos contaminados (Tuomela & Hatakka, 2015 y Rojas, 2013).

Durante la degradación de la lignocelulosa y xenobióticos por hongos o enzimas aisladas de estos hongos, los metales pesados interfieren tanto con la actividad de las enzimas extracelulares implicadas en el proceso como con la colonización de hongos. La capacidad de los hongos para adsorber y acumular metales junto con las excelentes propiedades mecánicas de los pellets miceliares de hongos proporciona una oportunidad para la aplicación de micelios de hongos en la sorción selectiva de iones individuales de metales pesados de aguas contaminadas (Baldrian, 2002).

2.12.1. MECANISMO DE BIORREMEDIACIÓN DE LA BIOMASA DE BASIDIOMICETOS

2.12.1.1. BIOSORCIÓN

En los últimos años una de las técnicas muy impulsadas por su eficiencia es la biosorción a través de la biomasa microbiana y sus productos (Gupta & Diwan, 2017 y Bulgariu & Gavrilescu, 2015).

La biosorción de metales pesados con microorganismos (bacterias, hongos, algas), es un proceso que utiliza biomasa viva o muerta para retirar o inmovilizar los iones metálicos de un medio líquido o sólido (Mejía, 2006 y García et al., 2016) a través de mecanismos fisicoquímicos (Cañizares, 2000 citado por Tejada, Villabona, & Garcés, 2015). Según Jing & Kjellerup (2017), éstos mecanismos son cuatro: (1) adsorción física, (2) intercambio iónico, (3) complejación (quelación) y (4) microprecipitación (Jing & Kjellerup, 2017). Por otro lado, Cañizares (2000) menciona que la biosorción se da a través de mecanismos fisicoquímicos como la adsorción o el intercambio iónico.

El mecanismo de eliminación por biosorción no está controlado por el metabolismo del microorganismo, sino principalmente por la adsorción superficial (García et al., 2016) debido a sustancias poliméricas extracelulares las cuales son una mezcla compleja de biopolímeros microbianos de alto peso molecular (procariotas y eucariotas). Uno de sus componentes esenciales es el exopolisacárido (EPS) liberado de autodefensa contra las duras condiciones de inanición, el pH y la temperatura, por lo que muestra propiedades fisiológicas, Reológicas y fisicoquímicas. Su composición

aniónica neta permite al biopolímero secuestrar eficazmente iones de metales pesados cargados positivamente(Gupta & Diwan, 2017).

Para que el proceso de bioadsorción se pueda realizar con éxito, debe existir una gran afinidad entre los grupos funcionales de la biomasa y el contaminante, ya que este último debe ser atraído hacia el sólido y enlazado por diferentes mecanismos (Cañizares, 2000 citado por Tejada, Villabona, & Garcés , 2015). Esta operación continúa hasta que se establece un equilibrio entre el adsorbato disuelto y el adsorbato enlazado al sólido(Verdugo, 2017).

En la Tabla 4 se registran los principales grupos funcionales y su afinidad por los iones metálicos. Los metales del grupo A tienden a formar enlaces con los ligandos de tipo I a través del átomo de oxígeno. Los elementos del grupo B, a su vez muestran una gran afinidad por los ligandos tipo III, pero además establecen fuertes uniones con los ligandos tipo II. Dicho sea de paso, los iones metálicos intermedios pueden establecer uniones con los tres tipos de ligandos con diferentes preferencias(Tejada, Villabona, & Garcés , 2015).

Tabla 4: Afinidad de grupos funcionales e iones metálicos

Tipo de ligandos	Ligandos	Grupos de metales
I: ligandos que prefiere al grupo A	F ⁻ , O ₂ ⁻ , OH, H ₂ O, CO ₃ ⁺² , SO ₄ ⁻ , RO ₂ SO ₃ ⁻ , NO ₃ ⁻ , HPO ₄ ²⁻ , PO ₄ ³⁻ , ROH, RCOO ⁻ , C=O, ROR	Grupo A: Li, Be, Na, Mg, K, Ca, Sc, Rb, Sr, Y, La, Fr, Ra, Ac, Al, Lantánidos, Actínidos
II: otros ligandos	CL ⁻ , Br ⁻ , N ₃ ⁻ , NO ₂ ⁻ , SO ₃ ²⁻ , NH ₃ , N ₂ , RNH ₂ , R ₂ NH, =N-, -CO-N-R, O ₂ , O ₂ ⁻ , O ₂ ²⁻	Iones intermedios:Ti, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Cd, In, Sn, Sb, As
III: ligandos que prefieren al grupo B	H ⁻ , I ⁻ , R ⁻ , CN ⁻ , CO, S ²⁻ , RS ⁻ , R ₂ S, R ₃ AS.	Grupo B: Rh, Pd, Ag, Lr, Pt, Au, Hg, Tl, Pb, Bi

Fuente:(Plaza, 2012)

Ligandos:

- **Las aminas(RNH₂)**

Compuestos que se obtienen cuando los hidrógenos del amoníaco son reemplazados o sustituidos por radicales alcohólicos (aminas alifáticas) o aromáticos (las aminas aromáticas). Dentro de las aminas alifáticas tenemos a las primarias (cuando se sustituye un solo átomo de hidrógeno), las secundarias (cuando son dos los hidrógenos sustituidos) y las terciarias (aquellas en las que los tres hidrógenos son reemplazados) (Arrollo, 2011).

- **La Amida(CO)**

Compuesto orgánico que consiste en una Amina unida a un Acido Carboxílico convirtiéndose en una Amina acida (o amida). Por esto su grupo funcional es del tipo RCONH", siendo CO un carbonilo, N un átomo de nitrógeno, y R, R' y R" radicales orgánicos o átomos de hidrógeno(Fabela, Bribiesca, & Barrios, 2012).

- **El cianuro(CN⁻)**

Sustancia química natural que se encuentra en bajas concentraciones en toda la naturaleza. El cianuro es el término general para los productos químicos que contienen un grupo ciano (triple enlace carbono y nitrógeno con la fórmula química CN) que ocurren naturalmente (Barrick, 2015).

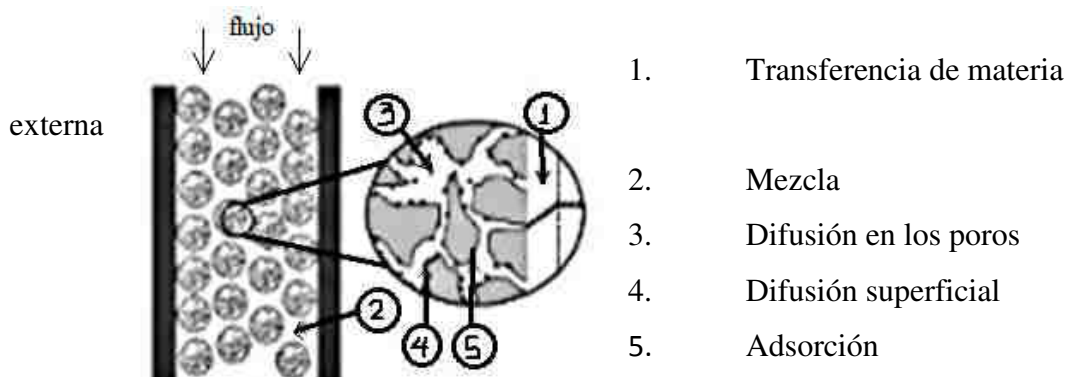


Figura 2: Esquema general de los mecanismos del proceso de adsorción en columna de lecho fijo

Fuente :(Izquierdo, 2010)

En el proceso de adsorción, la capacidad de remoción de iones metálicos del biosorbente va a depender de la influencia de ciertos factores como son el pH, el tamaño de partícula, la temperatura, y la concentración de la biomasa(Tejada, Villabona, & Garcés , 2015).

➤ **Influencia del PH**

Los cambios de pH tienen una incidencia inmediata en los procesos de adsorción ya que existen tres maneras en las que el pH influye en este proceso: el estado de los sitios activos de la biomasa varía con el pH del medio haciéndolos más o menos disponibles para el enlace con los compuestos en disolución; valores de pH extremos pueden dañar la estructura del material y es fundamental la especiación y solubilidad del metal en disolución que son factores que dependen directamente del pH(Chojnacka, 2010).

➤ **Influencia del tiempo de contacto**

El tiempo de contacto consiste en conocer el tiempo de equilibrio entre el soluto y el material, para que se complete el proceso de adsorción y así conocer la cinética del proceso de eliminación. Éste tiempo depende de algunos parámetros como la concentración del contaminante y la cantidad del adsorbente, normalmente los procesos de adsorción tienen tiempos cortos, llegando al equilibrio en unas pocas horas e incluso minutos (Verdugo, 2017).

➤ **Efecto de la fuerza iónica**

“Parámetro de gran importancia ya que al disminuir la fuerza iónica la eliminación del metal aumenta debido a la competencia por los sitios de enlace entre iones metálicos y de sales, al aumentar la fuerza iónica la adsorción disminuye” (Carro De Diego, 2012).

➤ **Presencia de otros compuestos**

“Generalmente, un agua residual no contiene únicamente un compuesto químico, sino que se compone de diferentes aniones o cationes. Por lo que es necesario realizar estudio de eliminación teniendo en cuenta la presencia de varios compuestos (Verdugo, 2017).

La capacidad de adsorción de los bioadsorbentes puede verse afectada por la existencia de otros iones metálicos en la disolución y los centros activos del material. Ésta incompatibilidad puede ocasionar la aparición de efectos competitivos entre las especies de la disolución y por consecuencia una variación en la capacidad de retención de los metales, respecto a su capacidad en disoluciones con un único adsorbato (Izquierdo, 2010).

Diferentes tipos de biosorbentes han sido utilizados en la remoción de metales pesados, incluyendo algas, hongos, bacterias y residuos agroindustriales (plantas, hojas, granos, etc.)

Tabla 5: Capacidad de biosorción (mmol/g) de diferentes tipos de biomosas

Tipo	Material	Cd	Pb	Cu
Hongos	<i>Rhizopus arrizus</i>	0.27	0.44	0.25
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	0.10	0.56	---
	<i>Rhizopus nigricans</i>	0.17	0.80	---
	<i>Rhizopus Oligosporus</i>	---	---	2.25
Algas	<i>Ascophyllum nodosum</i>	---	---	0.85
	<i>Sargassum hemiphyllum</i>	---	---	1.10
	<i>Sargassum sp.</i>	---	1.16	1.03
	<i>Cytoseira indica</i>	0.76	---	1.97
Bacterias	<i>Arthrobacter sp.</i>	0.11	---	0.13

Fuente: (Dávila , 2012)

2.13. COLUMNA DE LECHO EMPACADO

2.13.1. LECHO EMPACADO

La torre o lecho empacado es un sistema el cual es atravesado por un flujo (líquido o gas). Este sistema se conforma de partículas sólidas, con propiedades físicas y químicas similares, las cuales se encuentran en reposo (Amador, Ceballos, & Garcia, 2015).

2.13.2. CINÉTICA DE ADSORCIÓN

La velocidad del proceso de biosorción y el comportamiento dinámico del sistema son factores muy importantes para el diseño del proceso, el control de la operación y cualquier

aplicación de tipo práctico. Un buen modelo matemático se convierte en una herramienta importante ya que permite describir el comportamiento de todos los metales que son retenidos por un determinado biosorbente. Para ello, el modelo debe incorporar parámetros dinámicos que incluyan los aspectos que controlan la velocidad del proceso (Tenorio, 2006 mencionado por Lara, 2008).

El modelo más utilizado para representar el proceso de biosorción se basa en el modelo propuesto por Yagi y Kunii (1955) y consta de las siguientes etapas.

- a) Transferencia externa de materia, de los iones metálicos desde el seno de la fase fluida hasta las proximidades de la superficie externa del sólido biosorbente.
- b) Transferencia de materia interna o difusión, de los iones por el interior de los poros del sólido biosorbente.
- c) Adsorción de los iones metálicos en los centros activos del biosorbente.

Las dos primeras son etapas físicas de transferencia de materia, en cambio última etapa puede ser de carácter químico. Para obtener ecuación de cinética del proceso se combinarán de forma adecuada las ecuaciones de velocidad de las etapas elementales que integran el modelo global (Lara, 2008).

2.13.3. DINÁMICA DE SORCIÓN EN COLUMNA EMPACADA DE LECHO FIJO

Las columnas empacadas con un sólido adsorbente de lecho fijo es la forma más frecuente como se conducen las operaciones de intercambio iónico o adsorción.

La Figura 3 muestra el esquema de una columna de lecho fijo a través del cual circula un líquido que ingresa por el tope de concentración C . Durante el proceso, la concentración en ambas fases cambia con el tiempo y la posición en la columna. El fluido pasa a través del lecho a flujo constante (Armijo, 2016).

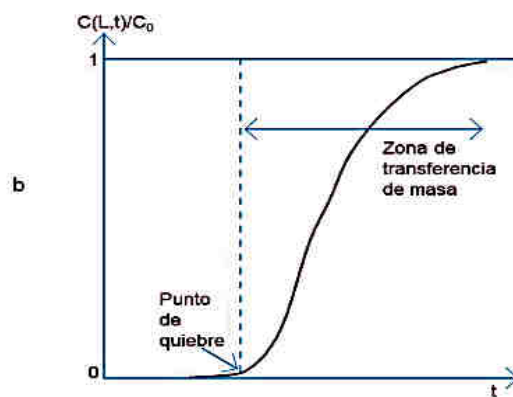


Figura 3: Esquema de una columna de lecho fijo

- a) Columna empacada con el sólido adsorbente. Un líquido cargado con un soluto o ion ingresa por el tope,
- b) concentración del sorbato a la salida del lecho en función del tiempo.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. UBICACIÓN ESPACIO-TEMPORAL

La investigación se realizó en los laboratorios de Biotecnología Agroindustrial y Análisis Instrumental de la Universidad Nacional Micaela Bastidas de Apurímac, ubicada en la Avenida Inca Garcilaso S/N del distrito de Tamburco, provincia de Abancay, departamento de Apurímac.

3.2. MATERIALES

3.2.1. CEPAS DE HONGOS BASIDIOMICETOS

Los basidiomicetos fueron colectados del Santuario Nacional del Ampay, provincia de Abancay, departamento de Apurímac, a partir de los que se obtuvieron sus cepas.

3.2.2. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

A continuación, se detallan los equipos, materiales y reactivos utilizados para la ejecución de la investigación.

EQUIPOS

- **Equipo de espectroscopia de absorción atómica:** ANALYTIC JENA mod. Contra 300
- **Balanza analítica:** VACUUMBRAND, capacidad 600g* 0.01g, modelo ES-200 A
- **Bomba de vacío:** FAMAREL68 L/m, capacidad 20atm, modelo GVP-10

- **Autoclave:** MEMMERT, capacidad 50 L, modelo 25x
- **Estufa:** LW SCIENTIFIC, capacidad 100 L, modelo UN 30
- **Microscopio:** ROBAX, potencia 12 V, capacidad de Aumento 4x100, modelo 4260
- **Molino analítico:** RETCH, capacidad 10000 RPM modelo GM 200

MATERIALES

- Matraz Erlenmeyer
- Tubos de ensayo con tapa rosca
- Probetas
- Beakers
- Fiolas
- Pipetas
- Placas de Petri
- Micropipeta

REACTIVOS

- **Agar papa dextrosa (PDA):** ICN Biomedicals
- **Caldo Saboraud:** ICN Biomedicals
- **Solución multimetal:** Merck IV
- **Agua ultrapura:** Merck

3.3. MÉTODOS

En el desarrollo de la investigación se realizaron los siguientes métodos de análisis:

3.3.1. TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACIÓN

La investigación científica es de carácter exploratorio y de nivel cuasi experimental.

3.3.2. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

3.3.3. POBLACIÓN

La población en estudio fueron basidiomicetos colectados del Santuario Nacional del Ampay (10 variedades) de los cuales se escogieron 4 tipos de basidiomicetos por sus cualidades de crecimiento rápido en condiciones de laboratorio y del mismo modo por la mayor cantidad de biomasa producida.

3.3.4. MUESTRA

La muestra fue obtenida a partir de cada uno de los cuatro basidiomicetos, de los que se produjo la biomasa que posteriormente fue secada y triturada.

- a. Técnica de muestreo; el muestreo fue al azar no probabilístico.
- b. Tamaño de muestra; el tamaño de la muestra fue extraída se acuerdo a los requerimientos para el experimento, para este trabajo se tomó 16 gramos de biomasa para cada variedad de basidiomiceto.

3.4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La ejecución de la investigación se dividió en 3 etapas, tal como se presenta en la figura 4:

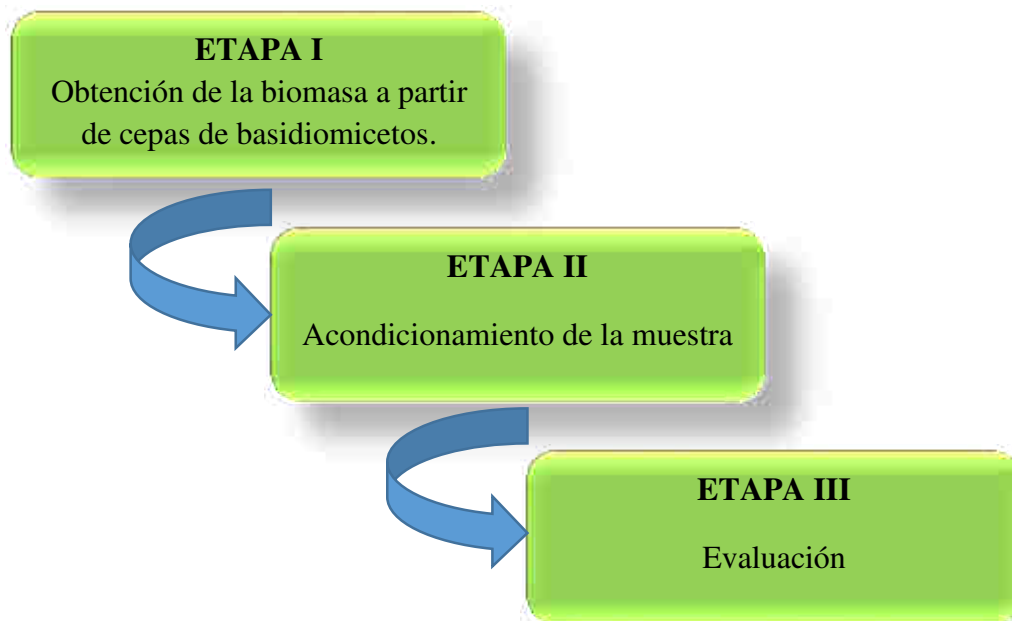


Figura 4: Etapas de la metodología experimental

3.4.1. ETAPA I: OBTENCIÓN DE LA BIOMASA A PARTIR DE CEPAS DE BASIDIOMICETOS

Para la obtención la biomasa es necesario realizar una serie de actividades previas, estas son: la colecta de hongos basidiomicetos, aislamiento de cepas, repique de cepas, inoculado para la producción de biomasa, además se realizó una identificación morfológica de los basidiomicetos y también se efectuó la evaluación en espectroscopia infra roja FTIR de la biomasa seca obtenida con el objetivo de identificar grupos funcionales que permitan explicar el nivel de retención de metales pesados por parte de esta biomasa.

3.4.1.1. COLECTA DE HONGOS BASIDIOMICETOS

La colecta se realizó utilizando una espátula de acero estéril para extraer los basidiomicetos del lugar de crecimiento natural. Se necesitaron guantes quirúrgicos para colocar los basidiomicetos dentro de bolsas de polietileno, cada uno por separado y debidamente codificados (cuadro 1).

Cuadro 1: Denominación y codificación de las cepas

Denominación	Codificación de la muestra
Basidiomiceto del Santuario del Ampay -002	BSA-002
Basidiomiceto del Santuario del Ampay -004	BSA-004
Basidiomiceto del Santuario del Ampay -007	BSA-007
Micorriza del Santuario del Ampay -001	MSA-001

3.4.1.2. AISLAMIENTO DE CEPAS

A continuación, se describen las operaciones realizadas para el aislamiento de las cepas:

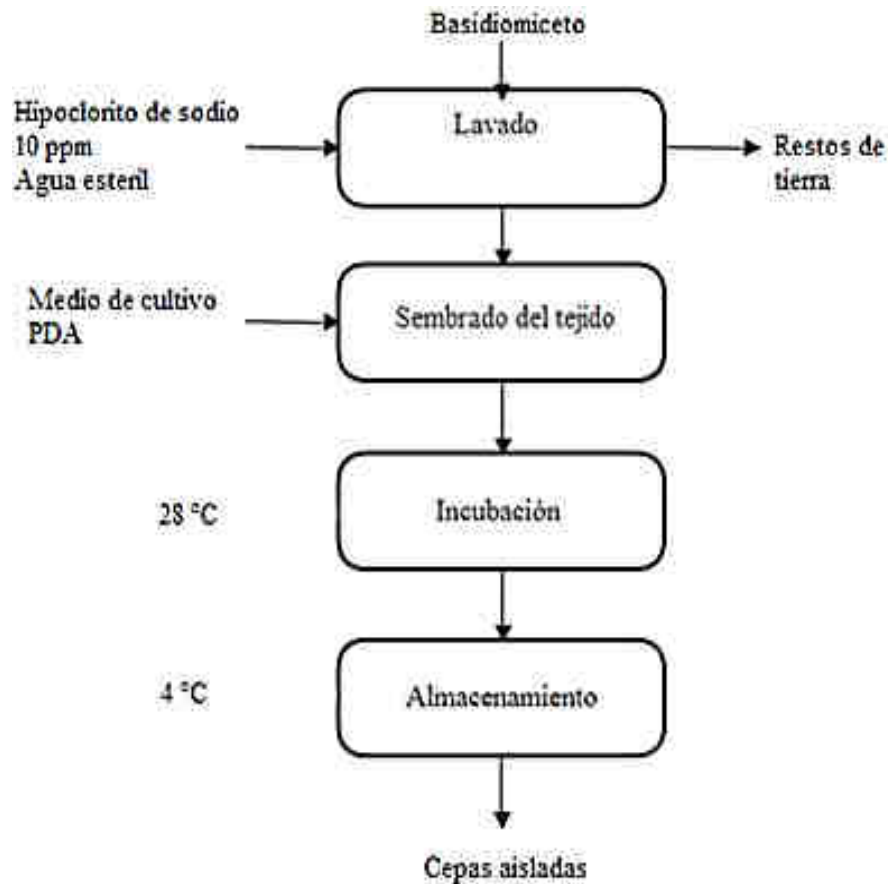


Figura 5: Diagrama de flujo para el aislamiento de cepas

- **Lavado**

Se realizaron lavados a temperatura ambiente a los basidiomicetos sumergiéndolos en agua estéril con hipoclorito de sodio a 10 ppm, ésta operación se realizó dos veces con el fin de eliminar restos de tierra y microorganismo diferentes al hongo, luego se procedió al enjuague con agua estéril.

- **Sembrado del tejido del basidiomiceto**

El aislamiento se realizó a partir del tejido es decir un fragmento del basidiomiceto, usando un bisturí para cortar trozos de 0.3 cm³ aproximadamente. Con la pinza se tomó un trozo del basidiomiceto y se sembró en placas Petri conteniendo PDA (Agar papa

dextrosa) como medio de cultivo con 1 ml de ampicilina (50 mg/ml) para inhibir el crecimiento de otros microorganismos.

- **Incubación**

Las placas Petri conteniendo el tejido de basidiomicetos fueron incubadas en una estufa a temperatura de 28 °C por 96 horas, en este tiempo ocurre la propagación del micelio.

- **Almacenamiento**

Las placas propagadas con micelio, fueron refrigeradas para detener su desarrollo y para permitir la conservación de la cepa hasta ser repicado en tubos de ensayo los cuales formaran parte del cepario.

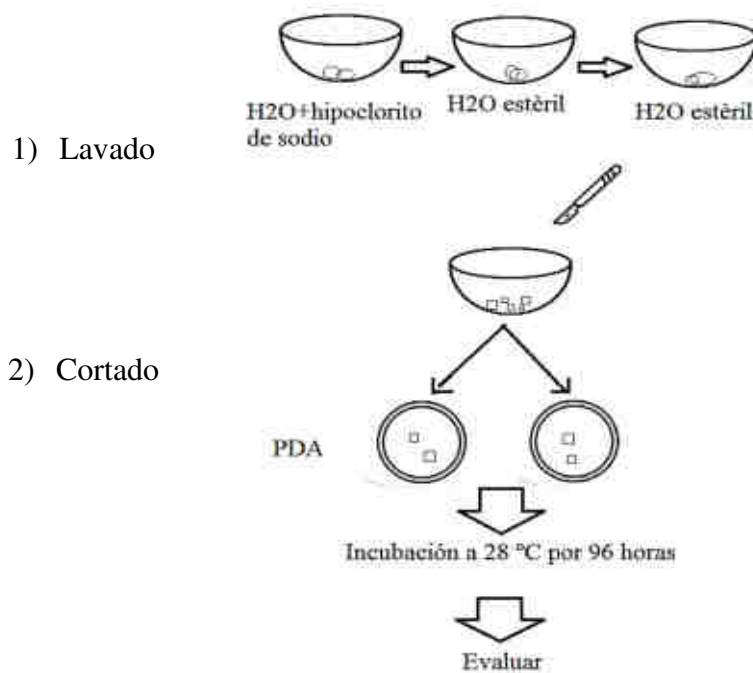


Figura 6: Aislado de cepas

3.4.1.3. REPIQUE

Se verificó la viabilidad de las cepas y crecimiento de micelios y se realizó el repique, que consistió en transferir el micelio a tubos inclinados o pico de flauta, conteniendo PDA con ayuda de un asa de siembra, cada uno por triplicado e incubado en estufa a 28°C por 72 horas. Parte de los tubos repicados sirvieron para la conservación de la cepa en refrigeración a 4°C y la otra parte fueron utilizados para el inoculo en la producción de biomasa, para esta última actividad, se tomó una porción de la cepa de los tubos y se repicó en placas Petri, se incubaron en la estufa a 28°C hasta que el micelio tubo un radio aproximado de 2 cm de diámetro.

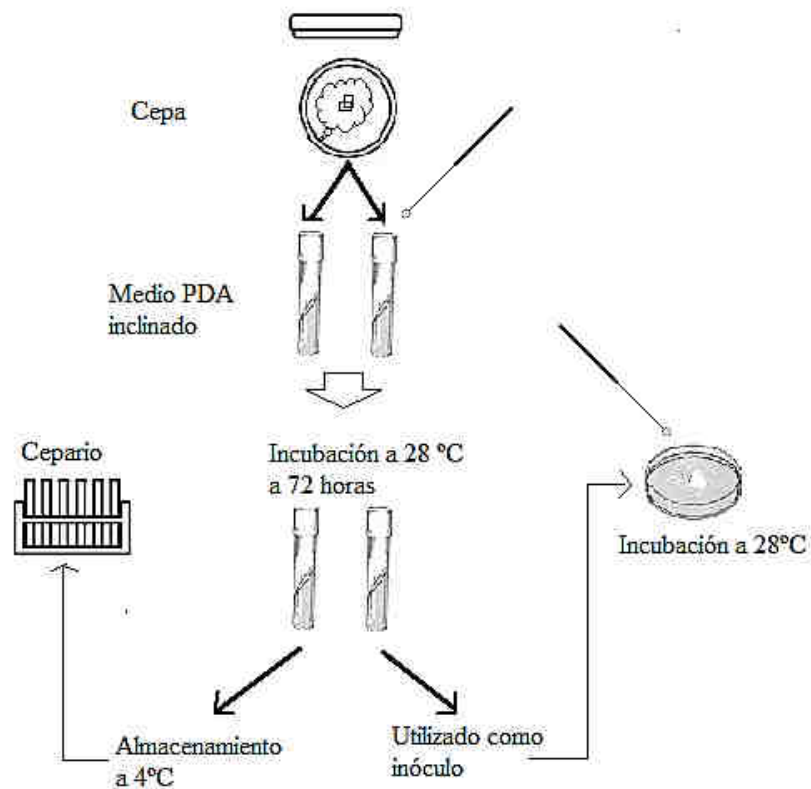


Figura 7: Repique de la cepa

3.4.1.4. INOCULADO

Éste paso consistió en retirar parte del micelio (en ambiente y con material estéril) de las placas de Petri usando un bisturí y adicionarlo directamente en frascos Erlenmeyers de 1 L conteniendo un medio de cultivo líquido y estéril con 750 ml de caldo Saboraud cada uno. Los Erlenmeyers cuentan con tapas de protección.

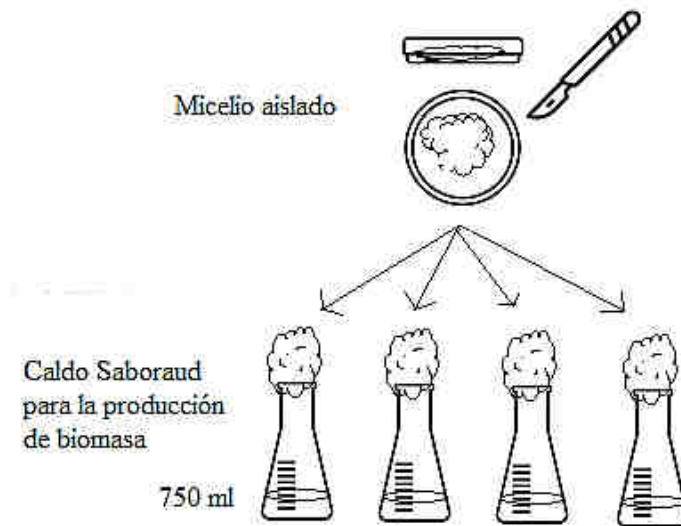


Figura 8: Inoculado

3.4.1.5. OBTENCIÓN DE LA BIOMASA

Se transportaron los frascos inoculados al agitador orbital o shaker, donde estuvieron en agitación constante de 120 rpm a 28°C durante 96 horas, para la producción de biomasa. Transcurrido este tiempo se procedió a filtrar la biomasa con un sistema de filtración con bomba de vacío, la biomasa retenida fue secada en la estufa a 60°C durante 48 horas, seguidamente fue triturada en un molino analítico por 2 minutos a 6000 rpm para uniformizar el tamaño de las partículas de la biomasa, luego se procedió a pesar en una balanza analítica y almacenar en frascos de vidrio.

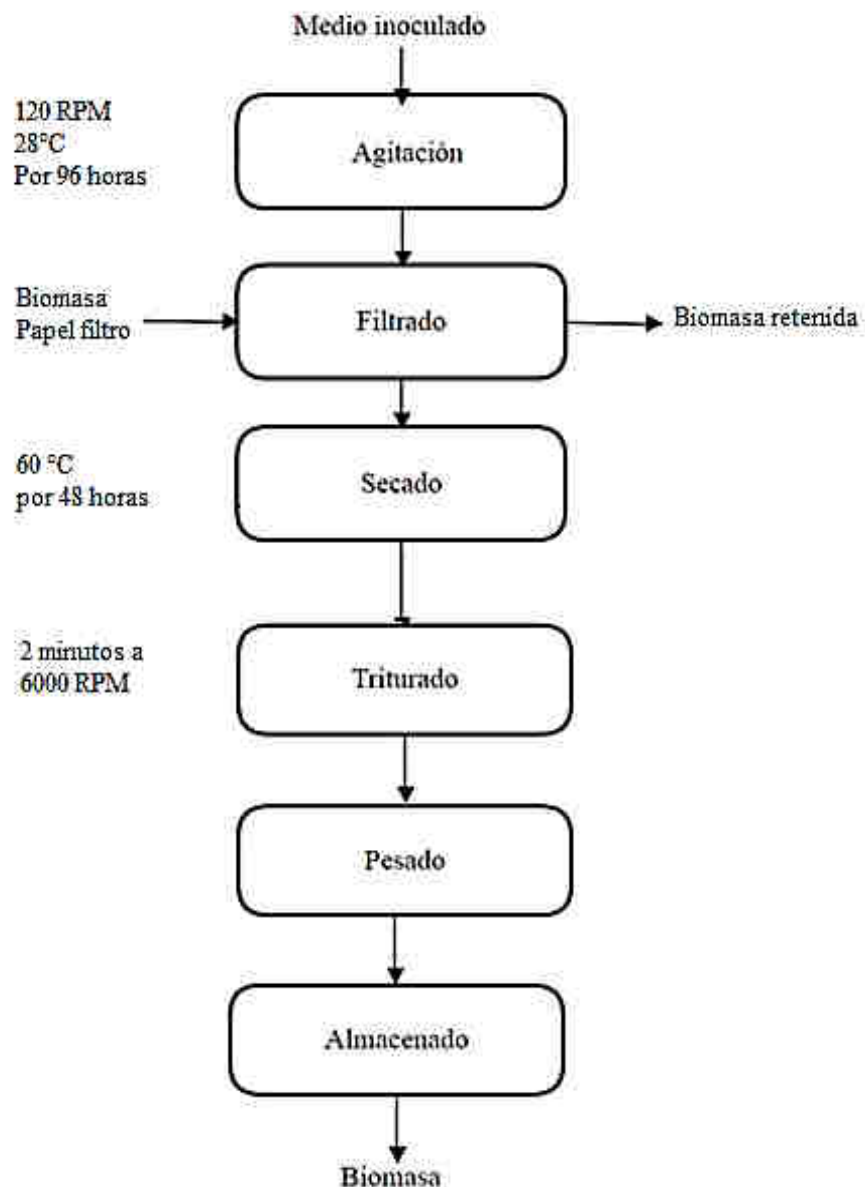


Figura 9: Diagrama de flujo para la obtención de biomasa

3.4.1.6. EVALUACIÓN DE LA BIOMASA EN ESPECTROFOTOMETRIA INFRAROJO (FTIR)

Se analizó la biomasa seca obtenida previo a ser rellenas a las columnas de lecho fijo para la biorremediación, con un espectrómetro de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR) (Thermo Scientific) en un rango de frecuencia de $4000-400\text{ cm}^{-1}$ con el

fin de identificar los posibles grupos funcionales ligados causantes de la retención de metales pesados por la biomasa mediante espectrometría FT-IR.

3.4.2. ETAPA II: ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA

La etapa II comprende el empaquetado de la biomasa en las columnas y la preparación de la solución patrón multielemental.

3.4.2.1. EMPAQUETADO

Se empaquetó la biomasa seca previamente tamizada por mallas serie Tayler hasta la malla numero 100 equivalente a 0.147 mm de diámetro de partícula, seguidamente se pesó cantidades iguales de biomasa de cada basidiomiceto y por último se rellenó en columnas de 1.5cm de diámetro interno, y de 15 cm de altura, con un soporte en la base y agujero de salida de agua.

3.4.2.2. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN PATRONMULTIELEMENTAL

Se preparó 2000 ml de una solución de Cobre (Cu), Plomo (Pb) y Cadmio (Cd), a una concentración de 20 ppm y pH 6.3, diluidos a partir de una solución estándar comercial, cuya concentración original es de 1000 mg/L, para ello se utilizó agua ultrapura calidad tipo I debido no contiene ningún tipo de sólidos, u materia orgánica, y se usó la fórmula siguiente:

$$V_1 * C_1 = V_2 * C_2$$

Donde:

V₁: Volumen inicial

V₂: Volumen final

C₁: Concentración inicial

C₂: Concentración final

3.4.3. ETAPA III: EVALUACIÓN

3.4.3.1. EVALUACIÓN DE LA COLUMNA DE LECHO POROSO

La filtración se realizó alimentando la muestra de agua con metales pesados de concentración conocida por la parte superior de la columna, el líquido atravesó el lecho haciendo contacto con la biomasa muerta, la porción de líquido (efluente) que atravesó el lecho se recibió en frascos de vidrio en varios intervalos de tiempo, lo que permitió realizar la cinética del proceso. A los frascos se rotularon y taparon para evitar su contaminación.

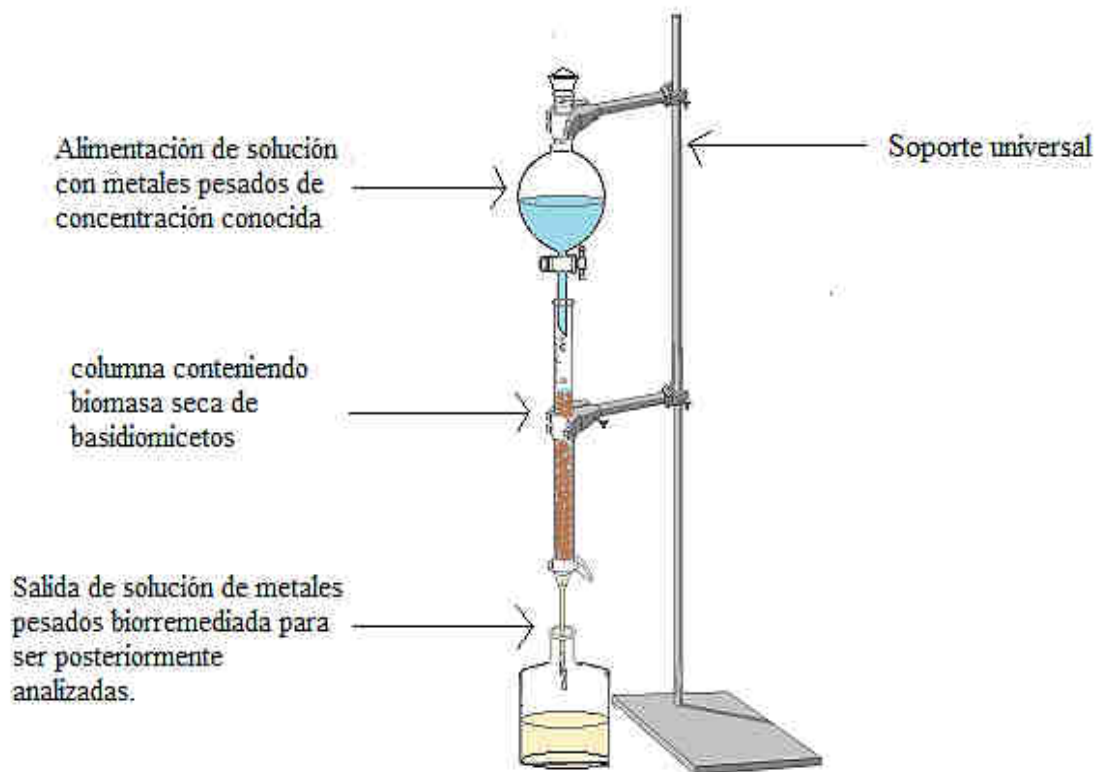


Figura 10: Sistema de filtración por lecho poroso acondicionado para la biorremediación de agua con metales pesados

a. Preparación de soluciones para la curva patrón

Para la curva patrón se preparó concentraciones de 0, 2, 5, 10, 15, y 20 ppm en 50 ml de agua ultrapura a partir de una la muestra multielemental con concentración inicial de 1000 mg/L equivalente a 1000 ppm utilizando una micropipeta. Se usó la fórmula de diluciones ($V_1 * C_1 = V_2 * C_2$) (anexo 5).

b. Caudal de alimentación de la solución de metales pesados

Se halló el caudal de alimentación de la solución de metales para cada cepa, la que fue suministrada por la parte superior del sistema y la recepción del efluente en la parte inferior. Para efectos de cálculo se utilizó la fórmula de caudal $Q = V/T$, donde: V es Volumen de solución de metales suministrado (ml) y T es el tiempo de contacto total (min).

c. Análisis de la concentración

Se analizó la concentración de la solución patrón y las muestras de agua biorremediada recolectada a distintos intervalos de tiempo para evidenciar la cinética de retención de metales pesados por la biomasa. El análisis se realizó en el equipo de Espectrofotometría de absorción atómica (EAA), en el que se trabajó con el método de flama, utilizando aire - acetileno como elemento de combustión. La metodología y parámetros fueron programados mediante el ordenador del equipo.

Cuadro 2: Longitud de onda para cada metal

ELEMENTO	TIPO	LONGITUD DE ONDA(nm)
Cobre (Cu)	Absorbancia	324.754
Plomo (Pb)	Absorbancia	217.001
Cadmio (Cd)	Absorbancia	228.802

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. RESULTADOS DE LA ETAPA I

4.1.1. COLECTA Y AISLAMIENTO DE HONGOS BASIDIOMICETOS PARA LA OBTENCIÓN DE BIOMASA

Los basidiomicetos fueron colectados en mes de febrero(época de lluvia) de los bosques que rodean la laguna Ankasq'ocha (laguna pequeña) del Santuario Nacional del Ampay el que se encuentra a 5 Km de la ciudad de Abancay hacia el norte ubicada a una altitud de 3,250 msnm.

Cuadro3: Coordenadas geográficas Santuario Nacional del Ampay: Laguna Ankasq'ocha (laguna pequeña)

Ubicación geográfica	Latitud sur	Longitud Este	Altitud msnm
Santuario Nacional del Ampay: Laguna Ankasq'ocha (Laguna Pequeña)	13°33'	72°51'	3,250

Fuente: (IDMAPERÚ, 2014)

El Santuario Nacional del Ampay con su amplio espectro de microclimas, alberga una gran diversidad de formas vegetales de altura, desde líquenes en roquedales hasta árboles de 15 m. de altura (Chachacomo, Intimpa, entre otros) (IDMAPERÚ, 2014). Dentro de esa gran diversidad de organismos se encuentran también varios tipos de hongos basidiomicetos algunos de los cuales se recolectaron para la presente investigación.

Se recolectaron 10 tipos de basidiomicetos de los cuales se escogieron cuatro especies las que presentaban mejor crecimiento en el medio de cultivo selectivo de PDA con ampicilina, así mismo mayor producción de biomasa.

En el siguiente cuadro se muestra los resultados de la identificación de los a nivel de género y cuya descripción se muestra a detalle en el anexo 1.

Cuadro 4: Identificación de basidiomicetos y cepas

Código de la muestra	Genero del basidiomiceto identificado
BSA-002	Geastrum
BSA-004	Hygrophorus
BSA-007	Cantharellus
MSA-001	Ectomicorriza

4.1.2. OBTENCIÓN DE BIOMASA

En cuanto a la producción de biomasa se obtuvo buen crecimiento a las 96 horas de inoculado el caldo Saboraud dextrosa, alcanzándose rendimientos distintos de biomasa seca (cuadro 5) así: el basidiomiceto Hygrophorus tuvo una mayor tasa de producción con valores de 5.50 ± 0.342 g/L, seguido de Geastrum con un valor de 4.34 ± 0.235 g/L, Cantharellus con 3.64 ± 0.129 g/L y por último y con menor producción en comparación con las demás biomásas, Ectomicorriza con un valor de 3.45 ± 0.754 g/L. Estos valores resultan iguales y/o superiores comparados con lo reportado por Rodríguez, Crescencia, Soria, Aguilera y Serrat (2016), quienes obtuvieron valores de biomasa seca de $1,38 \pm 0,01$ g/L de especies de basidiomicetos Trametes sp y $0,40 \pm 0,02$ g/L y de la especie Pleurotus sp, los cuales fueron inoculados en 50 ml medio caldo peptona a 120 rpm a 25 °C a tiempos mayores a 120 horas.

Cuadro5: Producción de biomasa a las 96 horas

Basidiomiceto	Producción de biomasa (g/L)
Geastrum	4.34 ± 0.235
Hygrophorus	5.50 ± 0.342
Cantharellus	3.64 ± 0.129
Ectomicorriza	3.45 ± 0.754

La diferencia de los valores de biomasa obtenidos en la presente investigación y lo reportado por los autores antes mencionados, puede atribuirse directamente al medio de cultivo, pues el crecimiento de hongos está estrechamente relacionado con la fuente de nutrientes disponible, fundamentalmente el carbono y el nitrógeno. En otras investigaciones se estudió la producción de biomasa, en diferentes medios para una misma especie de basidiomiceto, obteniéndose valores de biomasa de 1,4–7,5g/L en medios complejos enriquecidos con azúcares(González Rodríguez, 2015).

4.2. RESULTADOS DE LA ETAPA II

4.2.1. ACONDICIONAMIENTO DE LA MUESTRA

Posteriormente a la obtención de la biomasa, éstas fueron secadas y trituradas en partículas de 0.147 mm de diámetro para a continuación ser empaquetadas con pesos similares en las columnas de lecho poroso. El tamaño de partícula es también un parámetro importante en el proceso de biosorción, debido a que a menor dimensión de partícula existe un mayor número de centros activos disponibles para que se dé la reacción y una mayor facilidad para que el adsorbato (los metales pesados) accedan a ellos teniendo mayor dispersión (Verdugo, 2017), de igual manera Tejada, Villabona, & Marimòn (2014) mencionan los procesos de adsorción se dan en el interior de las partículas, sobre las paredes de sus poros en puntos concretos, la

capacidad que tiene el bioadsorbente para adsorber es directamente proporcional al área externa y a menor tamaño de partícula es mayor el área superficial de contacto.

A continuación, se muestra el cuadro 6 en el que se observa los pesos que se utilizaron para elaborar las columnas de biorremediación en estudio.

Cuadro 6: Pesos de biomasa seca para el empaquetado de columnas

Cepa	Peso seco la biomasa (g)
Geastrum	16.03
Hygrophorus	16.00
Cantharellus	16.02
Ectomicorriza	16.01

4.3. RESULTADOS DE LA ETAPA III

4.3.1. EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DEL SISTEMA DE BIORREDACIÓN PARA METALES PESADOS Y PARA CADA HONGO

En el cuadro 7 se muestran los resultados estadísticos según el análisis del diseño experimental obtenido (anexo 3). Los análisis de los datos obtenidos del sistema de biorremediación fueron evaluados para cada metal: cobre, plomo y cadmio, en función de cada hongo. Para la elaboración de este cuadro se efectuó un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia del 0.05, para ver si existen diferencias significativas entre cada hongo y su capacidad de retención de metal, seguido de una prueba de Tukey para establecer un ranking de los hongos probados en orden de importancia de retención de metal. Esto se realizó para cada metal y cada tipo de hongo y

también mediante un análisis multifactorial, el análisis completo se presenta detalladamente en el anexo 3.

Cuadro 7: Resultados estadísticos de ANOVA y TUKEY para los sistemas de biorremediación evaluados

<i>Ranking evaluado por prueba de Tukey</i>	<i>TIPO DE HONGO</i>	Porcentaje de retención de metal evaluado por prueba de ANOVA		
		Plomo	Cadmio	Cobre
1°	CANTHARELLUS	100 (a)	100 (a)	100(a)
2°	ECTOMICORRIZA	100 (a)	87.53(b)	56.56(b)
3°	HYGROPHORUS	74.79 (b)	41.29(c)	65.41(c)
4°	GEASTRUM	69.41 (c)	1.65(d)	0.63(d)

1°, 2°, 3° y 4°: representan el orden de importancia de los hongos en cuanto a porcentaje de retención de metales en estudio.

a, b, c y d: representan diferencias estadísticas significativas entre los hongos con un $\alpha = 0.05$

El cuadro 7, indica que los cuatro tipos de hongos evaluados son diferentes estadísticamente uno de otro, en función de su capacidad de retención de metales pesados, siendo el género CANTHARELLUS, el que mejores condiciones presenta para retener mayor porcentaje de Plomo, Cadmio y Cobre, y también se observa que el género GEASTRUM, es el hongo que menor capacidad de retención presenta para los mismos metales que están siendo evaluados, estos resultados se muestran en los siguientes gráficos.

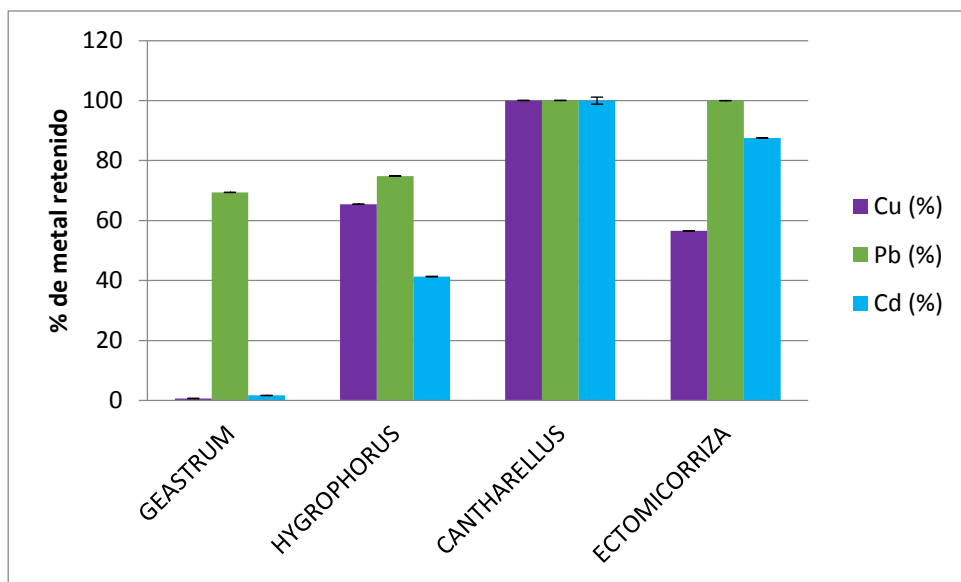


Gráfico 1: Retención de metales por cada tipo de basidiomicetos

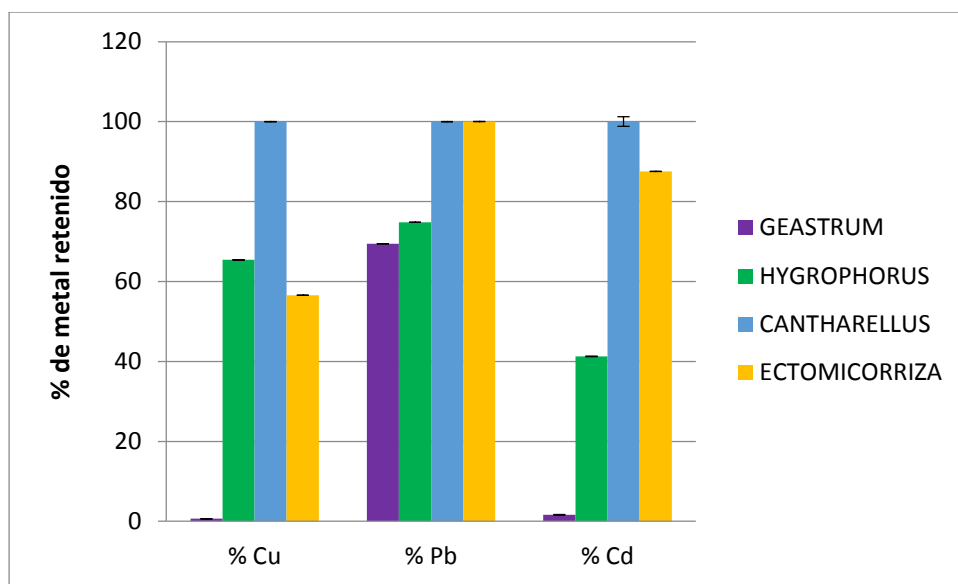


Gráfico 2: Evaluación de retención en función de cada metal y basidiomiceto

De los resultados y del análisis estadísticos efectuado se desprende que el hongo que mejor performance posee para ser utilizado en el sistema de biorremediación evaluado con lecho empacado es el género CANTHARELLUS, seguido del genero ECTOMICORRIZA, luego el HYGROPHORUS y finalmente el GEASTRUM; estos resultados debe indicarse fueron evaluados con un nivel de significancia de 0.95 ($\alpha=0.05$).

4.3.2. CINÉTICA DE RETENCIÓN DE METALES POR CADA TIPO DE HONGO

A continuación, se presentan las cinéticas de biosorción de los metales en función del tiempo y porcentaje de retención de cada metal y para cada tipo de hongo Geastrum (BSA-002), Hygrophorus (BSA-004), Cantharellus (BSA-007), Ectomicorriza (MSA-001).

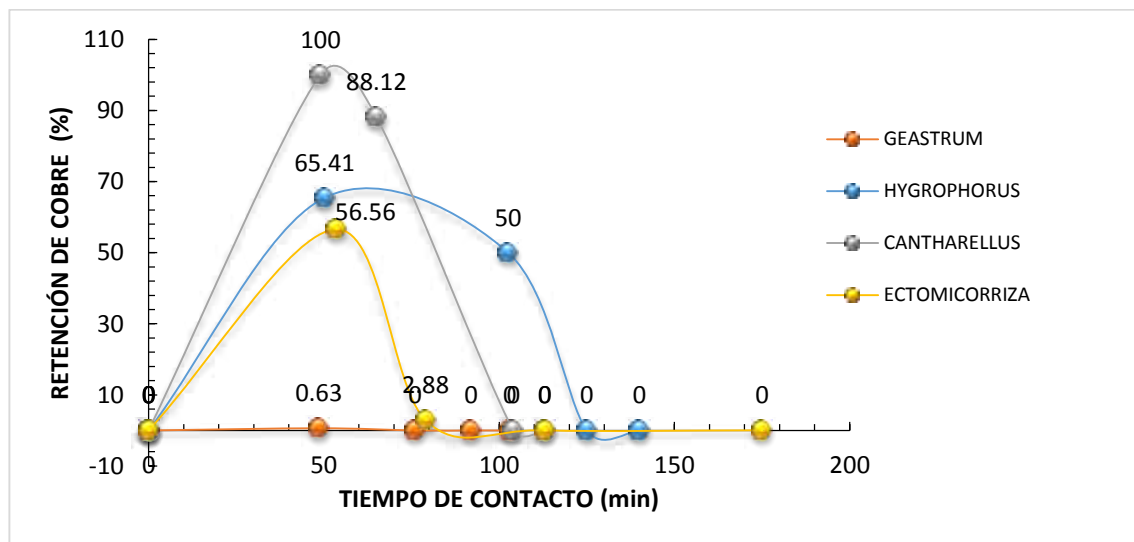


Gráfico 3: Cinética de retención de cobre para cada biomasa de basidiomicetos.

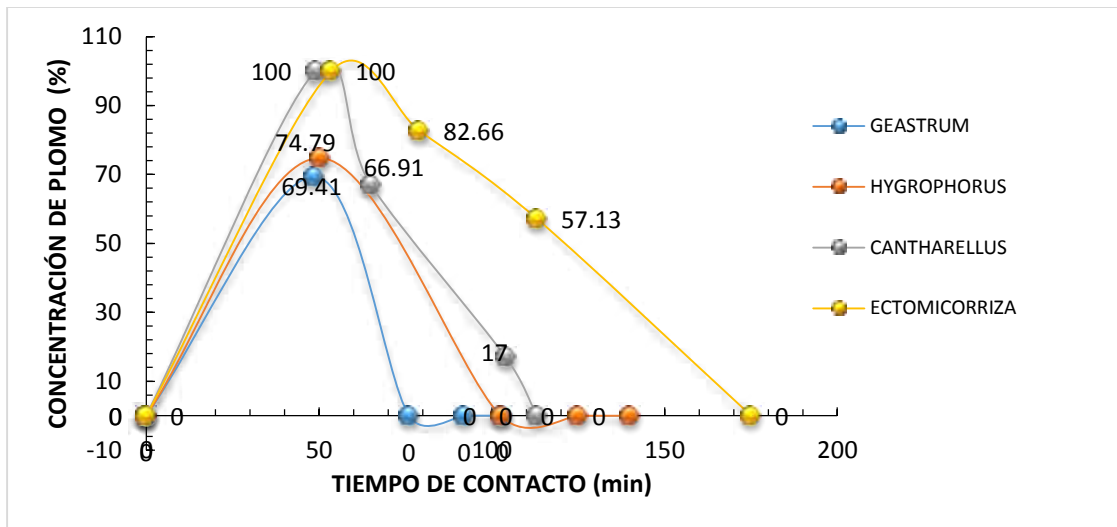


Gráfico 4: Cinética de retención de plomo por cada biomasa de basidiomicetos.

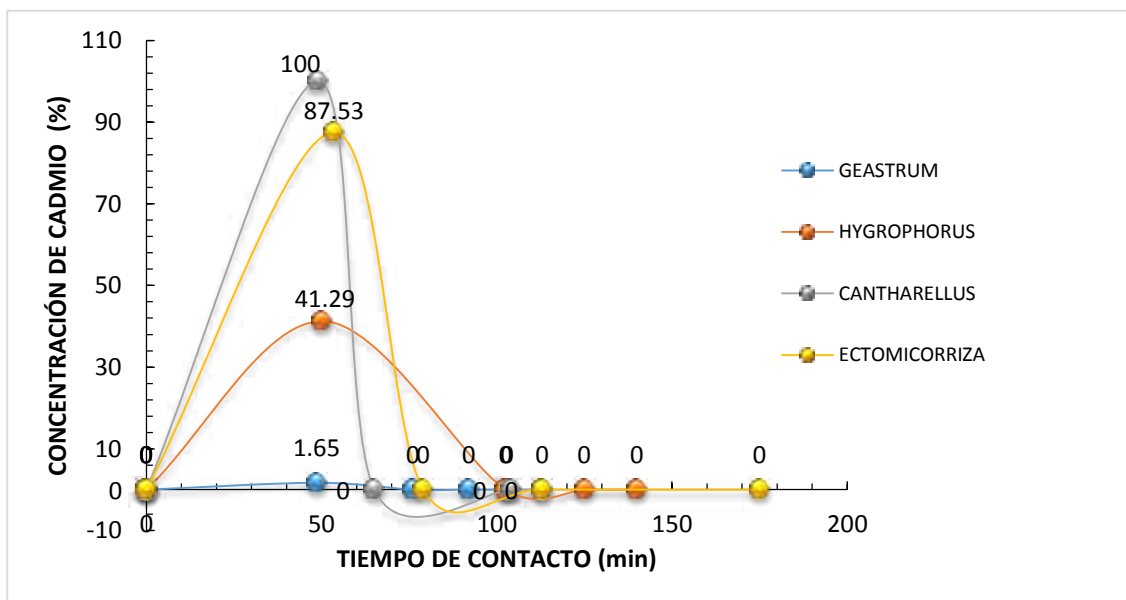


Gráfico 5: Cinética de retención de cadmio por cada biomasa de basidiomicetos.

A continuación, se muestran los siguientes gráficos en los que se representa la cinética de retención de Cu, Pb y Cd realizado por cada biomasa de los basidiomicetos estudiados.

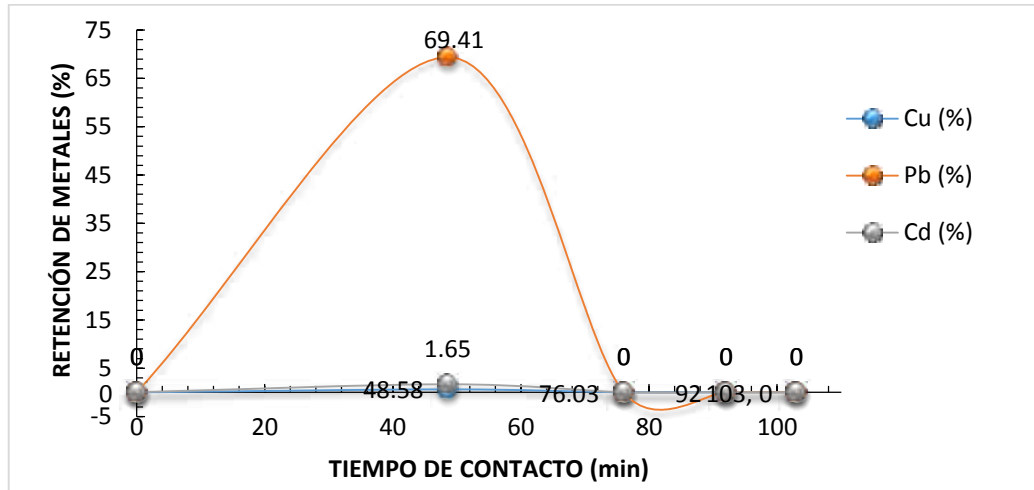


Gráfico 6: Cinética de retención de metales por la biomasa del basidiomiceto Geastrum.

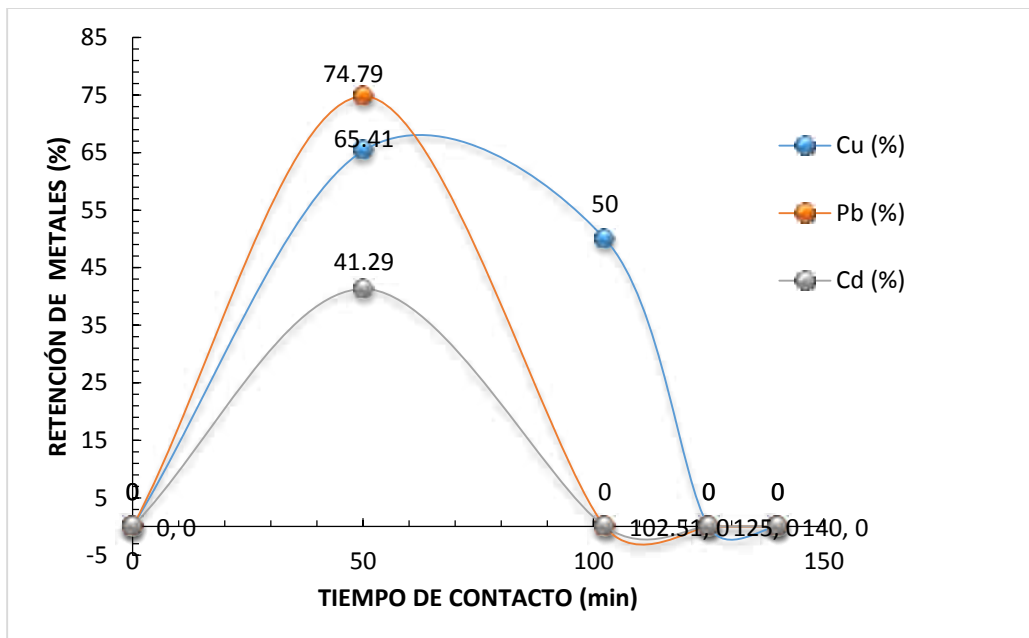


Gráfico 7: Cinética de retención de metales por la biomasa del basidiomiceto Hygrophorus.

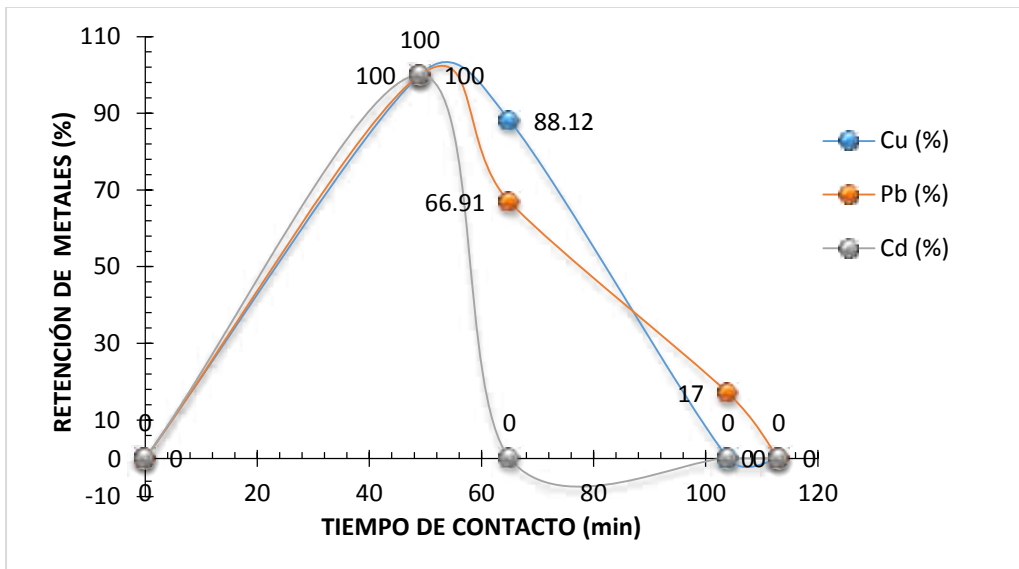


Gráfico 8: Cinética de retención de metales por la biomasa del basidiomiceto *Cantharellus*.

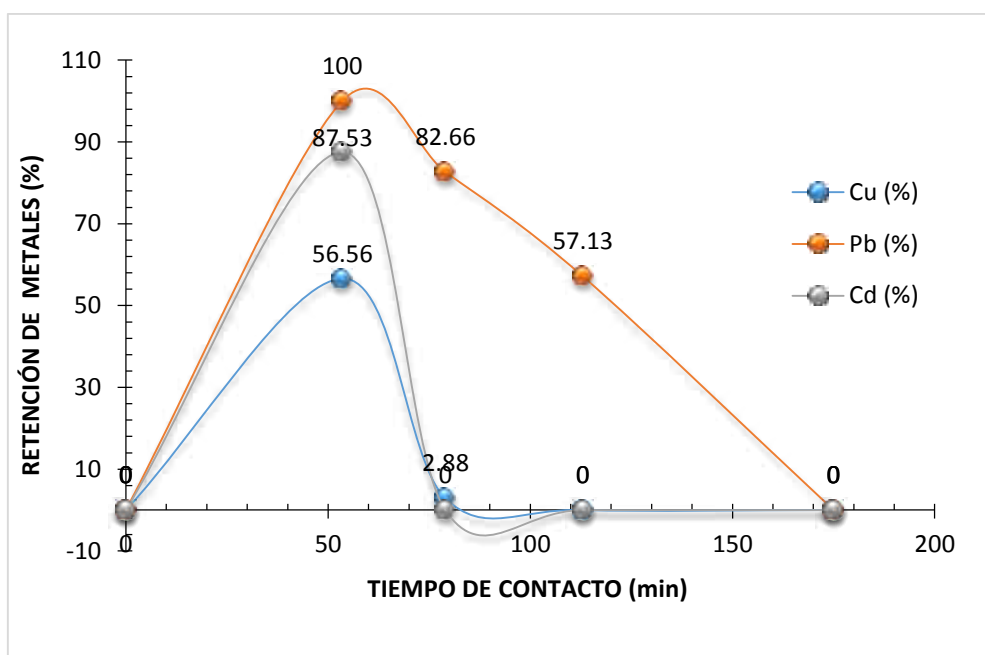


Gráfico 9: Cinética de retención de metales por la biomasa del basidiomiceto *Ectomicoriza*

El gráfico 3 muestra que la biomasa del basidiomiceto del género *Cantharellus*, presentó gran eficiencia en la retención de cobre con 100 %, seguido de la biomasa que pertenece al

género *Hygrophorus* quien tuvo una retención de 65.41 %, la biomasa de *Ectomicorriza* que con una retención de 56.56 %, y por último el *Geastrum* con un mínimo porcentaje de 0.63 % de cobre retenido. En el gráfico 4 se muestra que la biomasa del género *Cantharellus* tuvo un desempeño igual que el género *Ectomicorriza* pues retuvieron 100 % de plomo, la biomasa de *Hygrophorus* con un 74.79 % y por último la biomasa de *Geastrum* quien llego a retener 69.41 % de plomo. En cuanto a la retención de cadmio, se observa en el gráfico 5 que la biomasa de *Cantharellus* mostró mayor retención con un 100 %, seguido por la biomasa de *Ectomicorriza* con 87.53%, la biomasa *Hygrophorus* que retuvo un 41.29 %, y por último con una mínima retención de cadmio de 1.65 % la biomasa del basidiomiceto del género *Geastrum*.

En el gráfico 6 se observa que la biomasa de *Geastrum* retiene gran porcentaje de plomo (69.41 %) respecto al cadmio (1.65%) y el cobre (0.63%). En el gráfico 7 se observa que la biomasa de *Hygrophorus* retuvo en mayor porcentaje el plomo con 74.79 %, seguido de un 65.41% de cobre y un 41.29 % de cadmio. La biomasa de *Cantharellus* según el gráfico 8 es quien mostró gran eficiencia con un 100% en la retención de los tres metales. El gráfico 9 muestra la retención por la biomasa de la *Ectomicorriza*, en él se observa un mayor porcentaje retenido de plomo con 100 %, cadmio un 87.53 % y 56.56 % de cobre.

Discusiones:

Esta efectiva retención de metales por parte de la biomasa de cepas de basidiomicetos se atribuye al proceso de biosorción mediante sus mecanismos fisicoquímicos como son la adsorción o intercambio iónico (Cañizares, 2000) gracias a sustancias poliméricas extracelulares microbianas, ya que su composición aniónica neta permite al biopolímero

secuestrar eficazmente iones de metales pesados cargados positivamente (Gupta & Diwan, 2017). Ésta operación continúa hasta que se establece un equilibrio entre el adsorbato disuelto y el adsorbato enlazado al sólido (Verdugo, 2017).

En los procesos de adsorción intervienen el tipo y cantidad del grupo funcional presente, su disponibilidad y la afinidad que pueda existir entre el adsorbente en el metal. (Verdugo, 2017), en la presente investigación se considera que hubo una buena afinidad entre los grupos funcionales de la biomasa y los iones metálicos, tal como muestra Plaza (2012) en su tabla de “afinidad de grupos funcionales e iones metálicos”, el tipo de ligandos II tienen afinidad por el grupo de metales denominados Iones metálicos intermedios, dentro de los cuales se encuentran el cobre (Cu) y el cadmio (Cd), y los ligandos del tipo III: ligandos que prefieren al grupo B dentro del cual se encuentra el plomo (Pb). Así mismo según el análisis realizado con espectrofotometría infra roja FT-IR (anexo 4) se determinó que las biomásas presentan ligandos del grupo II y III como son las Aminas alifáticas primarias (RNH_2) $3280.80\text{-}3270.20\text{ cm}^{-1}$ de longitud de onda, el grupo carbonilo CO (Amidas I) presente en un rango de $1640.16\text{-}1629.07\text{ cm}^{-1}$ de longitud de onda y Cianuro (CN) presente en un rango de $1039.44\text{-}598.79\text{ cm}^{-1}$ de longitud de onda.

Por otro lado, García et.al (2016) y Verdugo (2017) mencionan que el pH de la solución de metales es un factor importante que determina la eficiencia de biosorción ya que tiene un impacto significativo en la captación de metal, pues cambia el estado de grupos funcionales y modifica sus interacciones con los contaminantes. A pH bajos la superficie del material puede cargarse positivamente de los cationes metálicos, en cambio valores muy altos de pH suelen dar problemas de precipitación del metal por consiguiente el pH

entre 5-8 suelen ser los más óptimos para que se den los procesos de adsorción. En la presente investigación el pH de la solución de metales (Cu, Pb y Cd) fue de 6.3 por lo tanto se puede decir que este valor se encuentra dentro del parámetro recomendado de biosorción, tal como lo demuestran los resultados de retención de metales por la cepa de basidiomicetos, los que fueron satisfactorios.

4.4. CAUDAL DE LA SOLUCIÓN DE METALES PESADOS

La velocidad de flujo es un parámetro importante para la evaluación del rendimiento de los biosorbentes por ello se midió un caudal de la solución de metales para cada cepa, la que fue suministrada por la parte superior de la columna. Dichos datos se muestran en el cuadro 8.

Cuadro 8: Caudal de la alimentación de la solución de metales pesados

Biomasa		Caudal (ml/min)
Geastrum	$\frac{250 \text{ ml}}{108.696 \text{ min}}$	2.3
Hygrophorus	$\frac{250 \text{ ml}}{139.665 \text{ min}}$	1.79
Cantharellus	$\frac{250 \text{ ml}}{104.167 \text{ min}}$	2.4
Ectomicorriza	$\frac{250 \text{ ml}}{219.298 \text{ min}}$	1.14

En el cuadro 08 se muestran los diferentes caudales de la solución de metales para cada tipo de biomasa, todos ellos como se observa fueron menores a 3 ml/min, así mismo algunos autores en sus investigaciones de adsorción en lecho poroso así como Villada, Hormaza, &

Casis (2014) usaron flujos de entrada de 3,4 - 8,2 mL min⁻¹ y un diámetro interno de columna de 1,5 cm, por otro lado Castellar, Cardozo, Suarez & Vega (2013) utilizaron una columna de vidrio de 2 cm de diámetro interno, dándose la máxima capacidad de adsorción a una altura del lecho de 5 cm un flujo volumétrico de 1 cm³ min⁻¹ (ml/min) y una concentración de alimentación de 5,5 mg dm⁻³. (mg/l) lo que refuerza la teoría de que a una velocidad de flujo rápida la capacidad de absorción disminuye en cualquiera de los procesos, intercambio iónico o adsorción (Kumar et al., 2011 mencionado en Zang et al., 2017).

Esto puede atribuirse que a velocidad de flujo rápida no puede dejar tiempo suficiente para que los iones metálicos se difundan en los poros del biosorbente. Esta situación se consigue con partículas pequeñas del sólido por lo que el proceso global se hace lento debido a la alta resistencia al flujo en la columna. Un flujo lento causa la difusión longitudinal, que consiste en la migración de especies en dirección del flujo o eje axial de la columna (Armijo, 2016).

4.5. RELACIÓN ENTRE EL PESO DE LA BIOMASA MUERTA Y EL VOLUMEN DE SOLUCIÓN MULTIMETAL BIORREMEEDIADA

Para realizar la relación fue necesario determinar el volumen total de solución multimetal (cobre, plomo y cadmio) utilizada en el sistema de biorremediación mediante la siguiente fórmula:

$$R = \frac{\text{Peso (g)}}{\text{Volumen (ml)}}$$

Esta relación va a permitir realizar un escalamiento a mayor magnitud, por si se pretende en un futuro trabajar con biomasa de las cuatro cepas de basidiomicetos estudiados en esta investigación.

Cuadro 9: Relación peso de biomasa y el volumen del metal para la biorremediación

	Relación peso/volumen (g/ml)	Metales	Capacidad de retención %
Geastrum	$\frac{16.02 \text{ g}}{250 \text{ ml}} = 0.064 \text{ g/ml}$	Cobre	0.63±0.060
		Plomo	69.41±0.001
		Cadmio	1.65±0.071
Hygrophorus	$\frac{16.01 \text{ g}}{250 \text{ ml}} = 0.064 \text{ g/ml}$	Cobre	65.41±0.012
		Plomo	74.79±0.004
		Cadmio	41.29±0.080
Cantharellus	$\frac{16.03 \text{ g}}{250 \text{ ml}} = 0.064 \text{ g/ml}$	Cobre	100±0.049
		Plomo	100±0.051
		Cadmio	100±1.197
Ectomicorriza	$\frac{16.00 \text{ g}}{250 \text{ ml}} = 0.064 \text{ g/ml}$	Cobre	56.56±0.017
		Plomo	100±0.005
		Cadmio	87.53±0.005

El cuadro 9 nos muestra que para la relación de 0.064 g/ml, la biomasa que tuvo la mayor capacidad de retención respecto las demás fue la biomasa del basidiomiceto Cantharellus, pues permitió una retención de cobre de 100±0.049 %, plomo 100±0.051 % y cadmio 100±1.197 %, seguido de la biomasa de la Ectomicorriza que permitió una retención de 56.56±0.017 % de cobre , 100±0.005 % de plomo y 87.53±0.005% de cadmio, la biomasa de Hygrophorus permitió una capacidad de retención de 65.41±0.012 % de cobre, 74.79±0.004% de plomo y 41.29±0.080 % de cadmio y la biomasa de Geastrum permitió una capacidad de retención de cobre de 0.63±0.060 %, plomo 69.41±0.001 % y cadmio de 1.65±0.071 %.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- Se logró desarrollar un sistema de biorremediación de metales pesados utilizando biomasa de basidiomicetos con alta eficacia para retener metales como el plomo, cadmio y cobre.
- Para el desarrollo del sistema a nivel de laboratorio de empaquetamiento de columnas de lecho poroso se utilizó biomasa seca de cuatro basidiomicetos, los cuales al identificarlos se determinó que pertenecían a los géneros *Geastrum*, *Hygrophorus*, *Cantharellus* y *Ectomicorriza*, y de los cuales se obtuvieron 4.34 ± 0.235 g/L, 5.50 ± 0.342 g/L, 3.64 ± 0.129 g/L y 3.45 ± 0.754 g/L en producción de biomasa respectivamente, a las 96 horas de inoculado en caldo Saboraud dextrosa.
- La máxima capacidad de biorremediación corresponde a la biomasa del basidiomiceto de género *Cantharellus*, quien retuvo un porcentaje de 100 ± 0.049 de cobre, 100 ± 0.051 de plomo y 100 ± 1.197 de cadmio, seguido del basidiomiceto del género *Ectomicorriza* que retuvo $56.56 \pm 0.017\%$ de cobre, 100 ± 0.005 % de plomo y 87.53 ± 0.005 % de cadmio, el basidiomiceto del género *Hygrophorus* retuvo un 65.41 ± 0.012 % de cobre, 74.79 ± 0.004 % de plomo y 41.29 ± 0.08 % de cadmio, por último el basidiomiceto del género *Geastrum* quien retuvo 0.63 ± 0.060 % de cobre, 69.41 ± 0.001 % de plomo y 1.65 ± 0.071 % de cadmio.

5.2. RECOMENDACIONES

- Dentro de un proyecto como este, siempre se desea que haya una mejora continua del mismo; por lo tanto, se recomienda a futuros estudiantes que tengan interés en el proyecto, estudiar el rendimiento económico de la producción de la biomasa de los cuatro basidiomicetos estudiados.
- Profundizar las investigaciones del basidiomiceto del género *Cantharellus* debido a su potencial como agente biorremediante. También se recomienda estudiar la eficiencia de metales distintos a los que se trabajó en el presente estudio.
- Realizar la optimización del sistema de biorredacción de metales con biomasa de basidiomicetos utilizado en el presente estudio para un escalamiento a nivel industrial.

BIBLIOGRAFÍA

- Amador, K., Ceballos, A., & Garcia, P. (4 de diciembre de 2015). *Lechos empacados*. Obtenido de Slideshare: <https://es.slideshare.net/karenesperanzaamadorlieraflores/lechos-empacados-55817854>
- Angel Alarcon, D. (2006). *Evaluacion de Tecnicas de Conservacion para Hongos Filamentosos y Levaduriformes en el Cepario Pontificia Universidad Javeriana*. Colombia: Tesis para optar titulo de Microbiologia Industrial.
- Armijo, J. (2016). Modelamiento matemático de la adsorción e intercambio iónico en columnas de lecho fijo. *Per. quím. Ing. Química*, 19(2), 77-95.
- Arrollo, P. (29 de octubre de 2011). *Aminas. Propiedades e importancia*. Obtenido de Quimica y algo más: <https://quimicayalgomas.com/quimica-organica/aminas/>
- Asturnatura. (2016). *Hongos-basidiomicetos: Características Generales*. Recuperado el 02 de Enero de 2017, de <https://www.asturnatura.com/articulos/hongos/basidiomycetes.php#caracteristicas-generales>
- ATSDR, A. p. (16 de Mayo de 2016). *Resúmenes de Salud Pública - Cobre (Copper)*. Atlanta: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU. Obtenido de ATSDR: https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_ph132.html
- Avedano, H., Martinez, R., & Caballero, P. (2013). Caracterización de dos cepas de Pleurotus djamor nativas de Oaxaca, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 1285-1291.
- Bakatula, E., Cukrowska, E., Weiersbye, I., Cozmuta, L., Peter, A., & Tutu, H. (2014). Biosorption of trace elements from aqueous systems in gold mining sites by the filamentous green algae (*Oedogonium* sp.). *Journal of Geochemical Exploration*, 144, 492-503.
- Baldrian, P. (2002). Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Elsevier Science*, 78-91.
- Barrick. (12 de 01 de 2015). Obtenido de Ques el cianuro y por que se utiliza en la micería : <https://barricklatam.com/barrick/presencia/republica-dominicana/blog/que-es-el-cianuro-y-por-que-se-utiliza-en-la-mineria/2015-01-27/204931.html>
- Batul, G. D. (2017). Bacterial Exopolysaccharide mediated heavy metal removal: A Review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. *Biotechnology Reports*, 13, 58-71.
- Brondz, I. (2014). Fungi: classification of the Basidiomycota. *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, 20-29.

- Bulgariu, L., & Gavrilesco, M. (2015). En *Bioremediation of Heavy Metals by Microalgae* (págs. 457-469). Romania: Handbook of Marine Microalgae.
- Cañizares, R. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 131-143.
- Castellar, G., Cardozo, B., Suarez, J., & Vega, J. (2013). Adsorción por lote y en una columna de lecho fijo del colorante B39 sobre el carbon activado granular. *Universidad Autonoma del Caribe*, 11(1), 66-75.
- Castillo, C. (05 de Junio de 2015). *Contaminación minera e intoxicación por metales pesados en el Perú*. Obtenido de Divagando: <https://divagando.lamula.pe/2015/06/05/contaminacion-minera-e-intoxicacion-por-metales-pesados-en-el-peru/ccperalta/>
- Coello, J., & Burgos, F. (2012). *Aplicación del hongo Pleurotus ostreatus como alternativa para la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados*. Guayaquil-Ecuador : Escuela Superior Politécnica del Litoral .
- Courtecuisse , R., & Duhem, B. (2000). *Guide des champignons de France et d'Europe" Los HONGOS. El reino fungi: caracteres generales*. Laussane-Paris: Delachaux et Niestl.
- Chojnacka, K. (2010). biosorption and bioaccculation-the prospects for practical applications. *Enviroment International*, 299-307.
- Dávila , N. (2012). *caracterizacion del proceso de biosorción de metales pesados mediante residuos sólidos* . México: Tesis de Doctorado en la universidad Autónoma de Nuevo León .
- Diego, C. d. (2012). *Eliminación de mercurio de efluentes acuosos con materiales de bajo coste: proceso combinado de Bioadsorcion-Reduccion*. España: Universidad de Coruña.
- Dominguez, D., Vázquez, H., Reyes, B., Arzaluz, J., & Martínez, A. (2013). Aislamiento y Purificación del Hongo Ectomicorrízico *Helvella Lacunosa* en Diferentes medios de cultivo. *Tropical and Subtropical Agroecosystems. Universidad Autónoma de Yucatán.*, 51-59.
- Elsemiarido. (15 de febrero de 2016). *Biorremediación: uso de plantas, algas, hongos y bacterias para transformar contaminantes*. Recuperado el 2 de febrero de 2017, de <http://www.elsemiarido.com/biorremediacionusodeplantasalgashongosybacteriasparatransformarcontaminantes/>
- Fabela, M., Bribiesca, A., & Barrios, D. (21 de Mayo de 2012). *AMIDAS*. Obtenido de Amidas: AMIDAS: <http://quimicaorganicaamidas.blogspot.pe/2012/05/amidas.html>

- Gaitán, R., Salmones, D., Pérez, R., & Mata, G. (2006). *Manual práctico del cultivo de setas: Aislamiento, siembra y producción*. Veracruz, Mexico: Instituto de Ecología A.C.
- García, R., Campos, J., Cruz, J., Calderón, E., Raynal, E., & Buitrón, G. (2016). Biosorption of Cd, Cr, Mn, and Pb from aqueous solutions by *Bacillus* sp. strains isolated from industrial waste activated sludge. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 19(1):5-14.
- González Rodríguez, L. (2015). Influencia de diferentes factores en el crecimiento de bacterias endófitas de caña de azúcar. *Revista colombiana de Biotecnología*, 17(2), 149-155.
- Graza, F. (2015). *Determinación de Pb, Cd, As en aguas del río Santa en el pasivo minero ambiental de Recuay, Ticapampa; Recuay-Ancash. (Tesis para optar título)*. Lima-Perú: Universidad Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica.
- Gupta, P., & Diwan, B. (2017). Bacterial Exopolysaccharide mediated heavy metal removal: A Review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. *Biotechnology Reports*, 13, 58-71.
- Hernández, D., & Loaiza, A. (2014). Selección de un método para la conservación y preservación de Actinomicetos aislados del suelo del Jardín Botánico De La Universidad Tecnológica De Pereira. En *Anteproyecto de Tesis para optar el grado de Tecnología química*. Colombia.
- IDMAPERÚ. (2014). *Diagnóstico y Plan Maestro del Santuario Nacional de Ampay*. Abancay-Apuímac.
- Iquimicas. (30 de Julio de 2012). *¿Qué son las cepas bacterianas?* Obtenido de <https://iquimicas.com/que-es-una-cepa-bacteriana/>
- Izquierdo, M. (2010). *Eliminación de metales pesados en aguas mediante bioadsorción, evaluación de materiales y modelación del proceso*. Valencia, España: Universidad de Valencia.
- Jing, R., & Kjellerup, B. (2017). Biogeochemical cycling of metals impacting by microbial mobilization and immobilization. *Journal of Environmental Sciences*.
- Lara, M. (2008). *Caracterización y aplicación de biomasa residual a la eliminación de metales pesados*. Granada- España: Universidad de Granada, Facultad de Ciencias, Departamento de Ingeniería Química.
- Loayza, R. (2016). *Daños ambientales de la Minería en el Perú: ¿Qué hacer con ellos?* Obtenido de Consorcio de Universidades : <http://www.metasbicentenario.consortio.edu.pe/mineria-y-ambiente/extenso-danos-ambientales-de-la-mineria-en-el-peru-que-hacer-con-ellos/>

- Londoño(1), L., Londoño(2), P., & Muñoz, F. (2016). Los Riesgos de los Metales Pesados nn la Salud Humana y Animal. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(2), 145-153.
- Luo, X. L., Deng, Z., & Lin, X. (2011). Renoval of copper(II) from aqueous solution in fixed-bed column by carboxylicacid funcionalized deacetylated konjac glucomannan. *polymer*, 753-759.
- Malnati, L. (2000). *La contaminación de las aguas en el peru: rol del ministerio de salud en su control*. Lima, Perú.
- Mattos, k. F. (2016). The good, the bad and the tasty: The many roles of mushrooms. (Elsevier, Ed.) *Fungal Biodiversity Institute*, 1-124.
- MECD-España (2016). *Biotecnología - 2º Bachillerato*. Recuperado el Enero de 2017, de Proyecto Biosfera: recursostic.educacion.es/ciencias/biosfera/web/alumno/2bachillerato/biotec/contenidos9.htm
- MEM. (2016). Proyectos mineros del futuro-Perú. *Revista proveedor minero*, 3-10.
- Mejía, G. (2006). Aproximación Teórica a la Biosorción de Metales Pesados por Medio de Microorganismos. Vol 1, No 1
- Mendoza, O. (2017). *Metales pesados y el agua de consumo en Colima: Una cuestión de salud pública*. Mexico: Universidad de Colima.
- MINAM. (2010). *Aprueban Límites máximos permiscibles para la descarga de efluentes líquidos de actividades minero-metalúrgicas: DS-Nº010-2010-MINAM/Ministerio del Ambiente*. Perú.
- MINAM, D. N.-2. (2017). *D.S Nº 004-2017-MINAM: Estares de Calidad Ambiental para el Agua*. Lima-Peru: ministerio del ambiente.
- MME. (2015). *Glosario Técnico Minero*. Bogotá D.C.: Ministerio de Minas y Energía- República de Colombia.
- Norma Oficial Mexicana, N.-A.-5.-1. (2001). *Análisis de aguas, determinación de metales, método espectrofotométrico de absorción atómica*. Mexico: Norma Oficial Mexicana (NOM-AA-51-1981).
- Ocola, J. (2015). *Protección del agua: vigilancia y control de vertimientos*. Autoridad Nacional del Agua (ANA). Obtenido de <http://www.ana.gob.pe/media/353227/4->

protecci%C3%B3n%20del%20agua%20vigilancia%20y%20control%20de%20vertimient
os%20paver.%20%20lic.%20juan%20ocola.pdf

- Ortiz Perez, R. (2012). *Hongos Ectomírrizicos* . Coahuila. Mexico: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro-Departamento de Agronomía.
- Pacioni, G. (1982). *Guía de Hongos*. Barcelona-España: Ediciones Grijalbo.
- Pacheco, J., & Serpas, R. (2013). *Evaluación de dos métodos para la conservación de cepas bacterianas de trabajo utilizadas en un laboratorio de control microbiológico de medicamentos*. San salvador, el salvador: universidad de el salvador-facultad de quimica y farmacia.
- Plaza, J. (2012). *Remoción de metales pesados empleando algas marinas*. Buenos Aires: Universidad Nacional de la Plata.
- Razmilic, B. (2016). *Espectroscopia de Absorción Atómica. Depósito de documentos de la FAO*. Chile: Merck Química Chilena.
- Rico, J. (2007). *Energía de la biomasa*. Madrid: IDAE (Instituto para la Diversificación y Ahorro de la Energía).
- Rocha, E. (2000). *Principios Básicos de Espectroscopia*. Mexico: UACH .
- Rodriguez, M. (1996). *Caracterización de cepas del hongo comestible pleurotos spp. en medios de cultivo y su evaluación en substratos lingnocelulosicos forrajeros para la produccion de carpóforos*. Mexico-Guadalajara: Universidad Autónoma de Nuevo León .
- Rodriguez, S., Crescencia, M., Soria, J., Aguilera, I., & Serrat , M. (2016). Determinación de biomasa fúngica y su utilidad en procesos biotecnológicos. *Centro de Estudios de Biotecnología Industrial, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente.Cuba.,* 60-67.
- Rojas, L. (2013). Los basidiomicetos: una herramienta biotecnologica promisoría con impacto en la agricultura. *Fitosanidad, 17*, 49-55.
- Sánchez, C. (2016). *Determinación de metales pesados en muestras de diferentes tipos de residuos líquidos mediante la técnica de absorción atómica. (Tesina de especialización)*. Mexico, D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México, facultad de Ingeniería, campo de conocimiento: Ingeniería Civil.
- Sora, G. (2016). *Descontaminación de suelos mediante la técnica de biorremediación "Landfarming"*. Recuperado el 26 de Enero de 2017, de

<http://blog.pucp.edu.pe/blog/remediacion/2016/10/06/biorremediacion-de-mercurio-utilizacion-de-bacterias/>

- Taylor, T., Krings, M., & Taylor, E. (2015). *basidiomycota*. Alemania: Elsevier.
- Tejada, C., Villabona, A., & Garcés, L. (2015). Adsorción de metales pesados en aguas residuales usando materiales de origen biológico. *Tecno Lógicas*, 109-123.
- Verdugo, J. (2017). *Bioadsorción de iones de plomo y cromo procedentes de aguas residuales utilizando la cáscara de la mandarina (Citrus reticulata var. clementina). Para optar título de ingeniero*. Cuenca-España: Universidad Politécnica Salesiana sede Cuenca, carrera de ingeniería ambiental.
- Vigo, F. d. (22 de Marzo de 2017). *Cómo medir y reducir la presencia de metales pesados en el agua, día mundial del agua*. Obtenido de http://www.farodevigo.es/especiales/dia-mundial-agua-2017/2017/03/medir-reducir-presencia-metales-pesados-agua-n1248_2_36323.html
- Villada, Y., Hormaza, A., & Casis, N. (2014). Uso de la cascarilla de arroz para la remoción de azul de metileno en columnas de lecho empacado. *Tecno Logicas*, 17(33), 54-54.
- Villamizar, A., & Caycedo, J. (2013). *Basidiomicetos. Fitopatología. Universidad de Pamplona. Departamento de Ingeniería*. Pamplona- España.
- Xu, J., Cao, Z., Zhang, Y., Yuan, Z., Lou, Z., Xu, X., & Wang, X. (2018). A review of functionalized carbon nanotubes and graphene for heavy metal adsorption from water: Preparation, application, and mechanism. *Chemosphere*, 351-364.
- Yagi y Kunii (1955). Modelos cinéticos para partículas esféricas de tamaño constante.
- Uruburu, F; García, M. (2012). *Coleccion Española de Cultivos (CECT)*. Valencia-España: Universidad Nacional de la Plata- Ingeniería Bioquímica.
- Zang, T., Cheng, Z., Lu, L., Jing, Y., Xu, X., Ding, W., & Qu, J. (2017). Removal of Cr(VI) by modified and immobilized *Auricularia auricula auriculaspent* substrate in a fixed-bed column. *Ecological Engineering*, 358–365.

ANEXOS

ANEXO 1: EVALUACIÓN MORFOLÓGICA DE BASIDIOMICETOS PARA SU IDENTIFICACIÓN

- **Evaluación macroscópica de los basidiomicetos**

La evaluación macroscópica de los cuerpos fructíferos de los basidiomicetos se realizó visualmente, haciendo una descripción morfológica: la forma, el color, tamaño y textura de cada uno de ellos. Se realizó utilizando las claves de determinación de Giovanni Pacioni en su “Guía de Hongos”.







- **Evaluación macroscópica de la cepa**

De la misma manera se realizó una evaluación visual a las cepas que y se describieron: el color, textura, y entre otras características. Se basaron principalmente en la metodología propuesta por Eger Martínez mencionada por Rodriguez M. , 1996 y Avedano, Martinez, & Caballero, 2013), en que se incluyen color, tipo de crecimiento, densidad, textura, crecimiento.

- **Evaluación microscópica del micelio**

Se realizó por la técnica de microcultivo para cámara húmeda. En placas Petri estériles se colocó papel filtro colocando encima un soporte de vidrio y sobre ellas se colocó una lámina portaobjetos. Por otro lado, se realizó el corte con un bisturí del PDA 1cm cuadrado, este se transfirió a la lámina porta objetos. Con otro bisturí se extrajo una porción del micelio y se colocó sobre la lámina portaobjetos que contenía el agar, seguidamente cubrió con un cubre objetos y se agregó agua estéril hasta una altura que no sobrepase el soporte de vidrio. Procediendo a incubarlos por 72 horas a una temperatura de 28°C. Pasados las 72 horas se retiró la lámina portaobjetos para la observación y fotografiado de hifas en el microscopio. A continuación, se muestra la descripción macro y microscópicas de los basidiomicetos y cepas.

Cuadro 1.1: Descripción de basidiomicetos seleccionados y cepas aisladas

Hongo	Descripción	Fotografías		
		Basidiomiceto(cuerpo fructífero)	cepa	Hifas (vista microscópica)
LBBSA-002	Hongo de color blanco-crema, con un orificio en el ápice del hongo en el que se encontraban las esporas. En la base presentó una capa en forma de estrella. Un tamaño de 2.5 cm y diámetro de 3.5 cm. Sustrato: tierra. La cepa presentó un color blanco de textura algodonosa y bastante compacta, tuvo un crecimiento regular, hacia arriba y no se extendió demasiado sobre el medio de cultivo. Microscópicamente el micelio muestra hifas rectas con septos y poco ramificadas.			
LBBSA-004	Hongos que crecen en grupo, con sombrerillos de 1 a 2 cm de diámetro. Con colores que variaban desde un color marrón claro a marrón oscuro, con tallo delgado y alargado de color amarillo. Sustrato de desarrollo: madera vieja. La cepa fue de color blanco poco algodonosa, con crecimiento regular distribuido sobre el medio de cultivo más no hacia arriba. Microscópicamente las hifas fueron septadas y de paredes gruesas y poco ramificadas.			

LBBSA-007

Forma de embudo con sombrero de 3cm de diámetro con pie grueso. De color amarillo claro a marrón, con pliegues que van desde el la parte inferior del pie hasta el sombrero. La cepa obtenida fue de color blanco, de textura poco algodonosa, y de crecimiento lento con mínima extensión sobre el medio de cultivo y así mismo poco crecimiento hacia arriba. Las hifas entremezcladas, septadas y ramificadas.



LBMSA-001

Conformado por micelio en forma de red (tipo tela de araña) y de textura relativamente algodonosa, la cual se encontraba rodeando las raíces la especie forestal denominado Intimpa. La cepa observada fue de color blanco, de textura algodonosa con crecimiento rápido distribuido homogéneamente a lo largo del medio de cultivo y hacia arriba. Las hifas entremezcladas, poco ramificadas, y con ausencia de septos.



El cuadro 1.1 muestra la descripción macro y microscópicas de los basidiomicetos, para su identificación se utilizó la “Guía de hongos” de Giovanni Pacioni (Pacioni, 1982).

El basidiomiceto BSA-002 pertenecería al género *Geastrum*, pues la descripción macroscópica del cuerpo fructífero coincide con lo reportado por Pacioni, quien menciona que este género se trata de un carpóforo globoso de color blanco-crema, se abre un orificio en el ápice del hongo del que salen las esporas. En la base presenta una capa en forma de estrella, tamaño de 2.5 cm y diámetro 3.5 cm, crece en tierra, en bosques de coníferas y entre los matorrales.

El basidiomiceto BSA-004 correspondería al género *Hygrophorus*, con sombrero de 2-5 cm. de diámetro, convexo o casi plano, poco carnoso, de textura lisa, de colores que varían de marrón, rojo marrón anaranjado, rojizo naranja. El himenio: constituido por pliegues casi distantes de color crema o amarillento. Pie largo, delgado y cilíndrico de color parecido a himenio, crece disperso, en grupos sueltos bajo bosques de coníferas sobre ramas de árboles caídos.

El basidiomiceto BSA-007 pertenecería al género *Cantharellus* el cual tiene Sombrero de aproximadamente 5 cm de diámetro en estado adulto, con forma embudada o plana, pero con una especie de ombligo en su zona central y de tallo grueso de color marrón grisáceo recubierto por fibras oscuras sobre un fondo amarillento. El borde ondulado y un tanto irregular.

El basidiomiceto MSA-001 según la descripción realizada sería una Ectomicorriza, un tipo de micorriza que se caracteriza por estar formados por una capa blanca y algodonosa de micelio que envuelve las raíces de la planta, las hifas del hongo no penetran en el interior de las células de la raíz, si no que se ubican sobre y entre las separaciones de estas. Se pueden observar a simple vista,

este tipo de micorrización predomina entre los arboles coníferas de zonas templadas, se producen principalmente sobre especies forestales y leñosas. Los hongos que la forman son tanto Basidiomycota como Ascomycota (Vacasela, S.F mencionado por Ortiz Perez, 2012).

ANEXO 2: EVALUACIÓN DEL SISTEMA DE BIORREDACIÓN Y ANÁLISIS DE LA CONCENTRACIÓN DE METALES PESADOS

En el cuadro 2.1 se muestran los tiempos de contacto de la biomasa y la solución con metales pesados, que permiten realizar una cinética de biosorción de este sistema con el porcentaje retenido de cada metal: cobre, plomo y cadmio, los que se encontraban inicialmente a concentraciones de 19.09, 20.24 y 19.4 mg/L respectivamente.

Cuadro 2.1: Porcentaje retenido de Cobre (Cu), Plomo (Pb), y Cadmio (Cd) respecto al tiempo de contacto

Cepa		Tiempo de contacto (min)	Cu (%)	Pb (%)	Cd (%)
BSA-002 (<i>Geastrum</i>)	T0	0	0	0	0
	T1	48.58	0.63±0.060	69.41±0.001	1.65±0.071
	T2	76.03	0.00	0.00	0.00
	T3	92.00	0.00	0.00	0.00
	T4	103.00	0.00	0.00	0.00
BSA-004 (<i>Hygrophorus</i>)	T0	0	0	0	0
	T1	50.19	65.41±0.012	74.79±0.004	41.29±0.08
	T2	102.51	50.00±0.024	0.00	0.00
	T3	125.00	0.00	0.00	0.00
	T4	140.00	0.00	0.00	0.00
BSA-007 (<i>Cantharellus</i>)	T0	0	0	0	0
	T1	49.00	100±0.049	100±0.051	100±1.197
	T2	65.00	88.12±0.270	66.91±0.062	0.00
	T3	104.00	0.00	17±0.30	0.00
	T4	113.00	0.00	0.00	0.00
MSA-001 (<i>Ectomicorriza</i>)	T0	0	0	0	0
	T1	53.53	56.56±0.017	100±0.005	87.53±0.005
	T2	79.00	2.88±0.017	82.66±0.0001	0.00
	T3	113.00	0.00	57.13±0.009	0.00
	T4	175.00	0.00	0.00	0.00

Donde: T1: Tiempo de contacto 1, T2: Tiempo de contacto 2, T3: Tiempo de contacto 3, T4: Tiempo de contacto 4

El tiempo de contacto en el que ocurre mayor retención de metales según lo observado en el cuadro 2.1 es a los 48.58, 102.50, 65.00 y 113.00 minutos que en promedio resulta 82 minutos, a mayor tiempo no hay más retención. Este dato coincide con lo reportado por Garcia et al. (2016) quienes establecen un tiempo de contacto de entre 80 y 120 minutos, superado este tiempo indica que ya no existe equilibrio entre el sorbente y contaminante y por ende la cantidad de metal adsorbido disminuye con el tiempo. En este suceso puede influir la altura del lecho, debido a que con el aumento en la altura del lecho la solución metálica permanece más tiempo en la columna, permitiendo que más iones metálicos se difundan dentro del biosorbente (Luo, Deng, & Lin, 2011 y zang et al., 2017).

Se tienen a continuación los porcentajes de retención de la biomasa de basidiomicetos por cada metal representados en gráficos de columnas con sus respectivas barras de error.

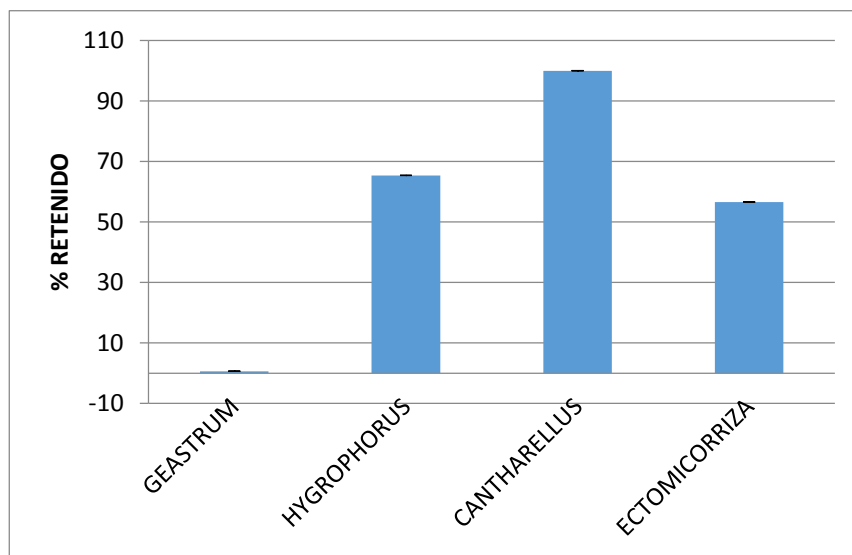


Gráfico 2.2: Porcentaje de Cobre retenido por los basidiomicetos.

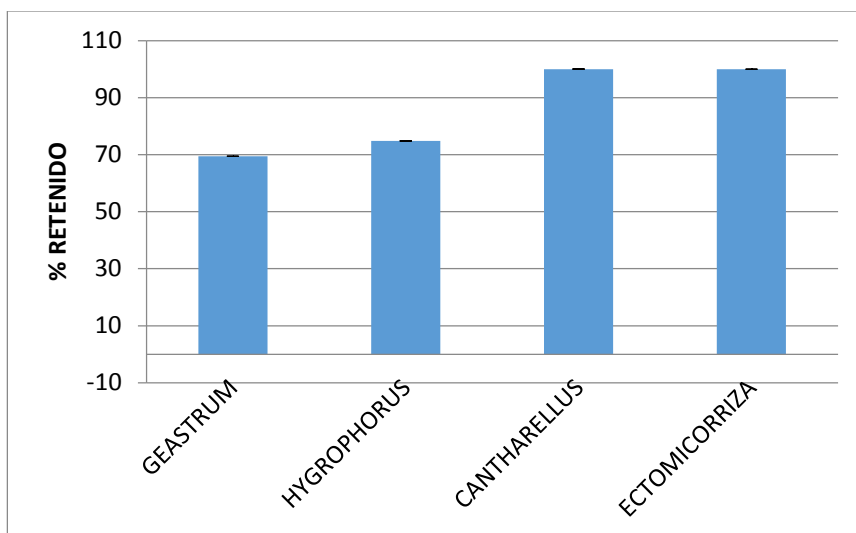


Gráfico 2.3: Porcentaje de Plomo retenido por los basidiomicetos.

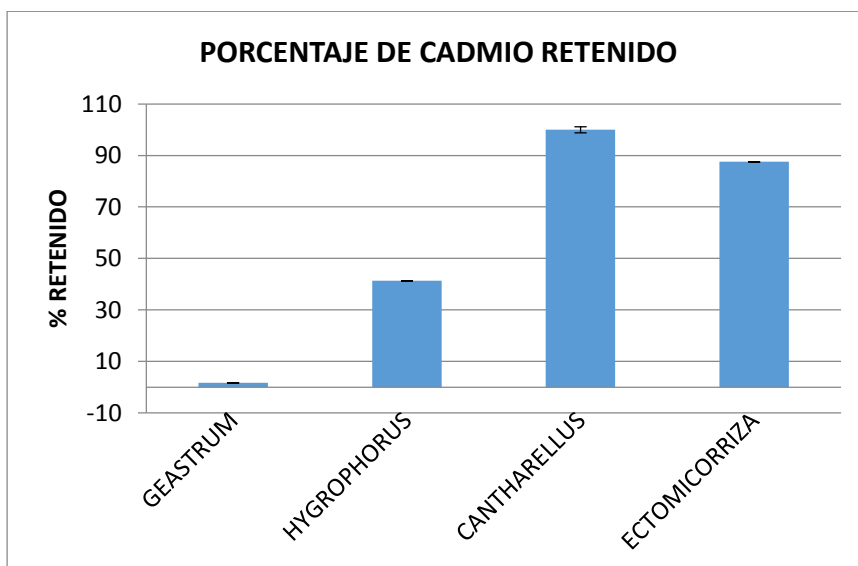


Gráfico 2.4: Porcentaje de Cadmio retenido por los basidiomicetos.

Se tienen a continuación los porcentajes de retención de metales por cada basidiomiceto representados en gráficos de columnas con sus respectivas barras de error.

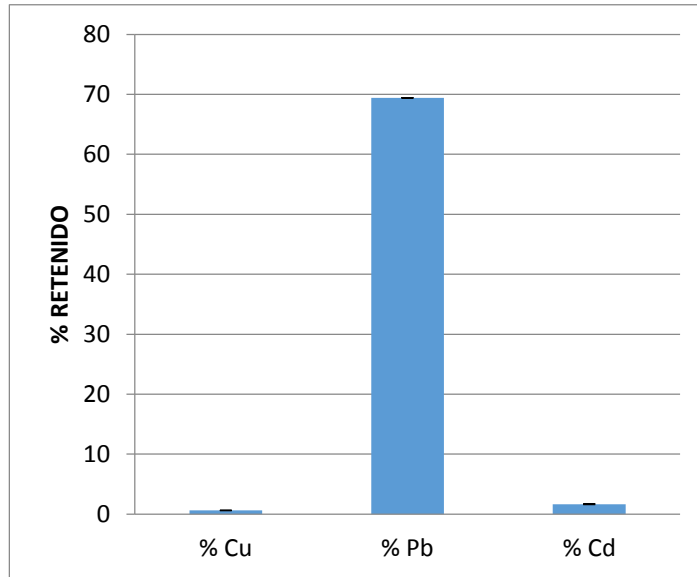


Gráfico 2.5: Porcentaje de metales retenido por *Geastrum*

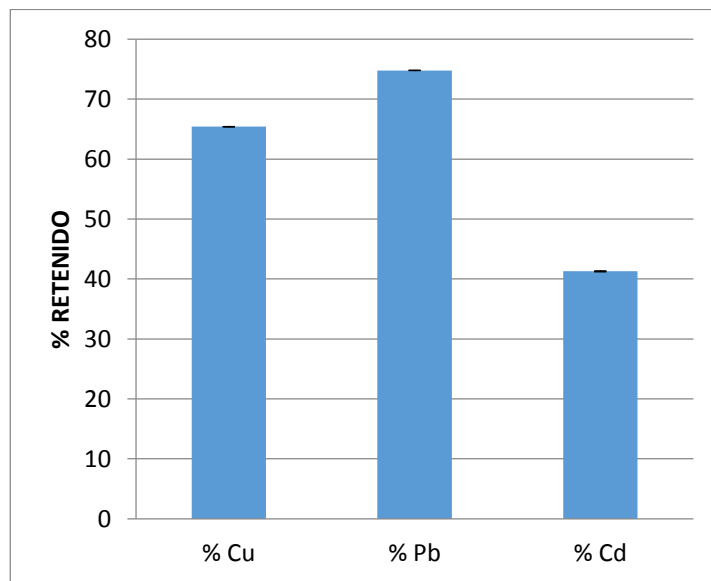


Gráfico 2.6: Porcentaje de metales retenido por *Hygrophorus*

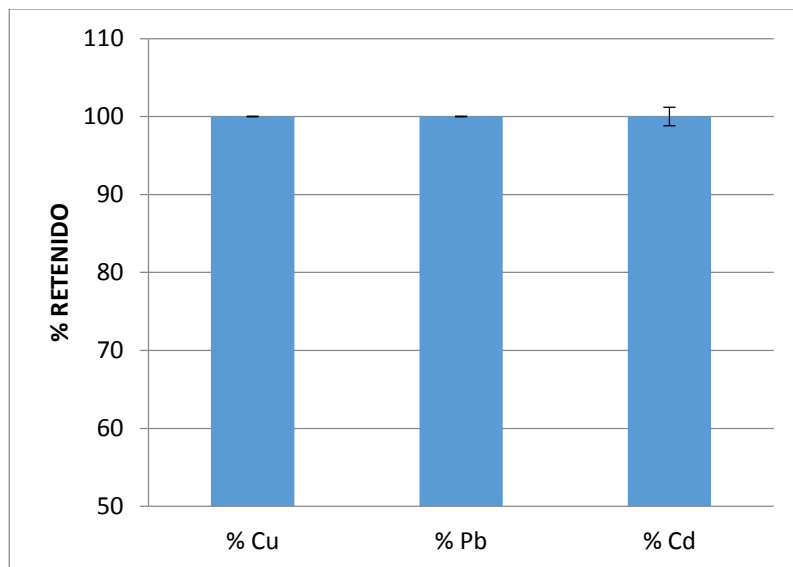


Gráfico 2.7: Porcentaje de metales retenido por *Cantharellus*

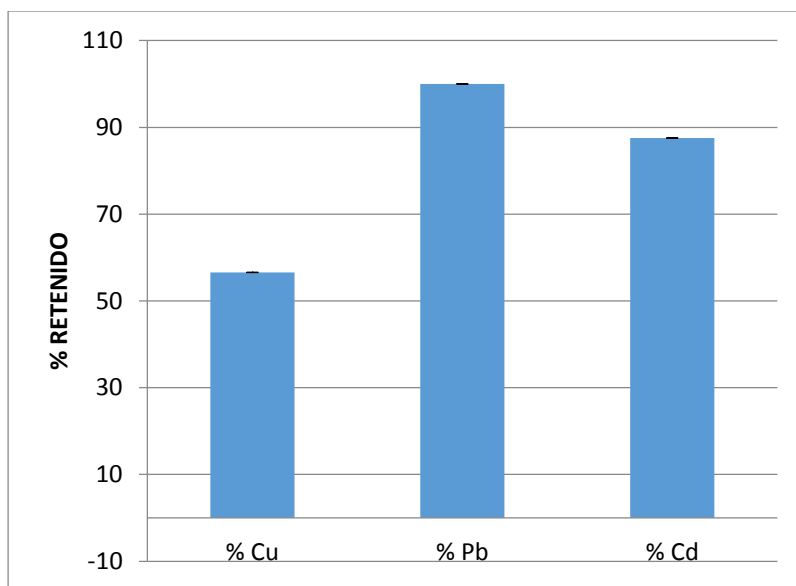


Gráfico 2.8: Porcentaje de metales retenido por *Ectomicorriza*

ANEXO 3: ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

3.1. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Para hacer el análisis estadístico se ha realizado previamente el diseño de la investigación, la cual fue cuasi experimental ya que no se controló las variables intervinientes y extrañas (humedad ambiental, temperatura del ambiente, condiciones de las infraestructuras etc.) dentro de la investigación.

El diseño estadístico a seguir fue un diseño de bloque completamente al azar con arreglo factorial 4x3 siendo un total de 12 tratamientos. Cuyo modelo matemático es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T + \beta_i + \alpha_j + (\beta \alpha)_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} : Variable dependiente (concentración de metales pesados en muestra de agua)

μ : Media global de todos los experimentos

T: Tratamientos

β_i : Factor 1 en estudio (capacidad de retención de metales pesados por biomasa de basidiomicetos)

i: niveles del factor 1

α_j : Factor 2 en estudio (evaluación del sistema de biorremediación)

j: niveles del factor 2

$(\beta \alpha)_{ij}$: Interacción de los niveles ij de los factores 1 y 2.

ϵ_{ij} : Error experimental para cada observación

En este caso se tuvieron cuatro columnas empacadas con cada tipo de biomasa de basidiomicetos los que interactuaron con tres metales pesados (Cu, Pb y Cd) cada uno.

Factor	Nivel	
A(T_i)	n_1	4
B(β_j)	n_2	3

Tratamientos experimentales

Numero de tratamientos	A	B
1	1	1
2	1	2
3	1	3
4	1	4
5	2	5
6	2	6
7	2	7
8	2	8
9	3	9
10	3	10
11	3	11
12	3	12

$$12/4 = 3$$

$$3/3 = 1$$

3.2. RETENCIÓN DE COBRE POR TIPO DE HONGO

Para el análisis estadístico, se ha realizado un ANOVA con un $\alpha= 0.05$ para cada metal y en los cuatro hongos, en la que el resultado se muestra en el cuadro N° 3.3.1:

Cuadro3.3.1: ANOVA para Cu Retenido (%) por TIPO DE HONGO

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	15270.6	3	5090.21	104952754.64	0.0000
Intra grupos	0.000388	8	0.0000485		
Total (Corr.)	15270.6	11			

La tabla ANOVA descompone la varianza de Cu Retenido (%) en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Cu Retenido (%) entre un nivel de TIPO DE HONGO y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Pruebas de Múltiple Rangos para Cu Retenido (%) por Tipo de Hongo

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

<i>TIPO DE HONGO</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
GEASTRUM	3	0.63	X
ECTOMICORRIZA	3	56.56	X
HYGROPHORUS	3	65.41	X
CANTHARELLUS	3	100.0	X

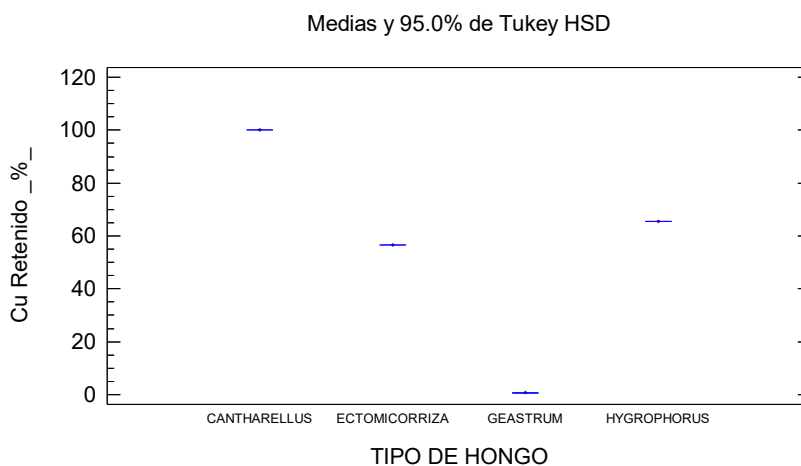
<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
CANTHARELLUS - ECTOMICORRIZA	*	43.44	0.0182029
CANTHARELLUS - GEASTRUM	*	99.37	0.0182029
CANTHARELLUS - HYGROPHORUS	*	34.59	0.0182029
ECTOMICORRIZA - GEASTRUM	*	55.93	0.0182029
ECTOMICORRIZA - HYGROPHORUS	*	-8.85	0.0182029
GEASTRUM - HYGROPHORUS	*	-64.78	0.0182029

* indica una diferencia significativa.

Para verificar esto se ha realizado un análisis de pruebas múltiples y con prueba de Tukey para realizar un ranking de los hongos teniendo como variable respuesta el porcentaje de cobre retenido, se puede apreciar que los cuatro tipos de hongos analizados, son todos estadísticamente diferentes uno de otro, siendo el mejor hongo es decir aquel que retiene mayor cantidad de cobre el género CANTHARELLUS, esto se puede visualizar en el gráfico de medias y prueba de TUKEY que nos da un ranking de cada hongo en función de la cantidad de cobre retenido.

CONCLUSIÓN

Para la retención de cobre el mejor hongo es el CANTHARELLUS, con una media de retención del 100 % al 95% de confianza y el hongo con menos efectividad de retención para el metal cobre es el GEASTRUM con una media de 0,63 %.



3.3. RETENCIÓN DE PLOMO POR TIPO DE HONGO

Para el análisis estadístico, se ha realizado un ANOVA con un $\alpha = 0.05$ para cada metal y en los cuatro hongos, en la que el resultado se muestra en el cuadro N° 3.3.2:

Cuadro 3.3.2: ANOVA para Pb Retenido (%) por TIPO DE HONGO

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	3810.24	3	1270.08	49904945.97	0.0000
Intra grupos	0.0002036	8	0.00002545		
Total (Corr.)	3810.24	11			

La tabla ANOVA descompone la varianza de Pb Retenido (%) en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro de grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Cu Retenido (%) entre un nivel de TIPO DE HONGO y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Pruebas de Múltiple Rangos para Pb Retenido (%) por TIPO DE HONGO

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

<i>TIPO DE HONGO</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
GEASTRUM	3	69.41	X
HYGROPHORUS	3	74.79	X
ECTOMICORRIZA	3	100.0	X
CANTHARELLUS	3	100.0	X

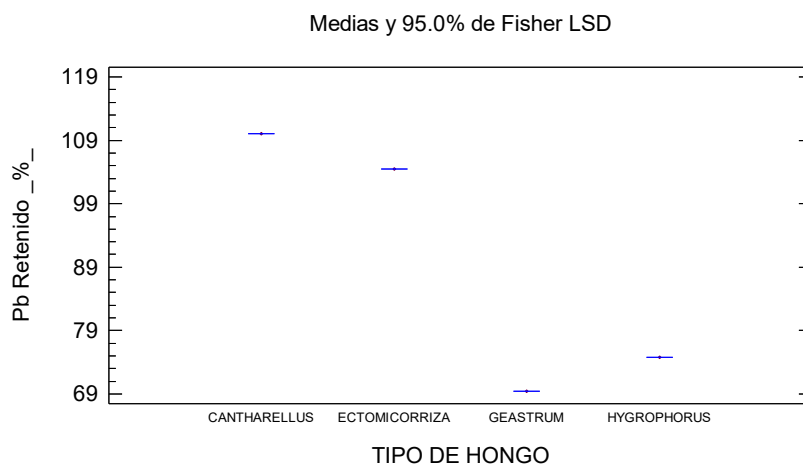
<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
CANTHARELLUS - ECTOMICORRIZA		5.57	0.013186
CANTHARELLUS - GEASTRUM	*	40.69	0.013186
CANTHARELLUS - HYGROPHORUS	*	35.31	0.013186
ECTOMICORRIZA - GEASTRUM	*	35.12	0.013186
ECTOMICORRIZA - HYGROPHORUS	*	29.74	0.013186
GEASTRUM - HYGROPHORUS	*	-5.38	0.013186

* indica una diferencia significativa.

Para verificar esto se ha realizado un análisis de pruebas múltiples y con prueba de Tukey para realizar un ranking de los hongos teniendo como variable respuesta el porcentaje de plomo retenido, se puede apreciar que entre CANTHARELLUS y ECTOMICORRIZA no existe diferencia significativa mientras que los otros tipos de hongos analizados son todos estadísticamente diferentes uno de otro, siendo los que retiene mayor cantidad de plomo el género CANTHARELLUS y ECTOMICORRIZA, esto se puede visualizar en el gráfico de medias y prueba de TUKEY que nos da un ranking de cada hongo en función de la cantidad de plomo retenido.

CONCLUSIÓN:

Para la retención de plomo el mejor hongo es el CANTHARELLUS y ECTOMICORRIZA, con una media de retención del 100 % al 95% de confianza y el hongo con menos efectividad de retención para el metal plomo es el GEASTRUM con una media de 69.41%.



3.3. RETENCIÓN DE CADMIO POR TIPO DE HONGO

Para el análisis estadístico, se ha realizado un ANOVA con un $\alpha= 0.05$ para cada metal y en los cuatro hongos, en la que el resultado se muestra en el cuadro N° 3.3.3:

Cuadro 3.3.3: ANOVA para Cd Retenido (%) por TIPO DE HONGO

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	22629.3	3	7543.09	420907.87	0.0000
Intra grupos	0.143368	8	0.017921		
Total (Corr.)	22629.4	11			

La tabla ANOVA descompone la varianza de Cadmio Retenido (%) en dos componentes: un componente entre-grupos y un componente dentro de grupos. Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Cd Retenido (%) entre un nivel de TIPO DE HONGO y otro, con un nivel del 95.0% de confianza.

Pruebas de Múltiple Rangos para Cd Retenido (%) por TIPO DE HONGO

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

<i>TIPO DE HONGO</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
GEASTRUM	3	1.65	X
HYGROPHORUS	3	41.29	X
ECTOMICORRIZA	3	87.53	X
CANTHARELLUS	3	100.0	X

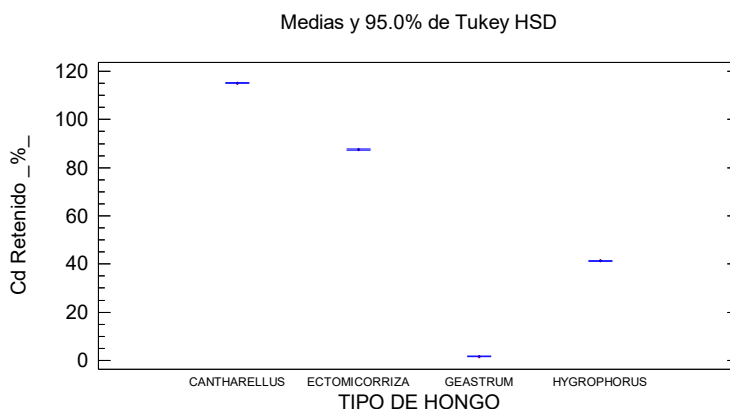
<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
CANTHARELLUS - ECTOMICORRIZA	*	27.59	0.349905
CANTHARELLUS - GEASTRUM	*	113.47	0.349905
CANTHARELLUS - HYGROPHORUS	*	73.83	0.349905
ECTOMICORRIZA - GEASTRUM	*	85.88	0.349905
ECTOMICORRIZA - HYGROPHORUS	*	46.24	0.349905
GEASTRUM - HYGROPHORUS	*	-39.64	0.349905

* indica una diferencia significativa.

Para verificar esto se ha realizado un análisis de pruebas múltiples y con prueba de Tukey para realizar un ranking de los hongos teniendo como variable respuesta el porcentaje de cadmio retenido, se puede apreciar que los cuatro tipos de hongos analizados, son todos estadísticamente diferentes uno de otro, siendo el mejor hongo es decir aquel que retiene mayor cantidad de cadmio el género CANTHARELLUS, esto se puede visualizar en el gráfico de medias y prueba de TUKEY que nos da un ranking de cada hongo en función de la cantidad de cadmio retenido.

CONCLUSIÓN:

Para la retención de cobre el mejor hongo es el CANTHARELLUS, con una media de retención del 100 % al 95% de confianza y el hongo con menos efectividad de retención para el metal cadmio es el GEASTRUM con una media de 1.65%



3.4. RESUMEN DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO POR RANKING

Cuadro 3.4.1: Resumen del análisis estadístico por ranking para cada basidiomiceto

BASIDIOMICETOS	MEDIA %			RANKING
	COBRE	PLOMO	CADMIO	
GEASTRUM	0.63	69.41	1.65	IV
HYGROPHORUS	56.56	74.79	41.29	III
ECTOMICORRIZA	65.41	100	87.53	II
CANTHARELLUS	100	100	100	I

El ranking según el cuadro 05 se explica de la siguiente manera:

- ❖ Para la retención de cobre el mejor hongo es el CANTHARELLUS, con una media de retención del 100 % al 95% de confianza y el hongo con menos efectividad de retención para el metal cobre es el GEASTRUM con una media de 0,63 %.
- ❖ Para la retención de plomo el mejor hongo es el CANTHARELLUS, con una media de retención del 100 % al 95% de confianza y el hongo con menos efectividad de retención para el metal plomo es el GEASTRUM con una media de 69.41 %.
- ❖ Para la retención de cadmio el mejor hongo es el CANTHARELLUS, con una media de retención del 100 % al 95% de confianza y el hongo con menos efectividad de retención para el metal cadmio es el GEASTRUM con una media de 1.65 %.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO MULTIVARIABLE

Para confirmar los resultados presentados a nivel individual, se ha efectuado el análisis multivariable donde la variable dependiente es el % de metal retenido y las variables independientes son la variedad de hongo (4 tipos) y el metal analizado (tres tipos), este análisis se presenta a continuación:

ANOVA Multifactorial para % RETENIDO

Variable dependiente: % RETENIDO

Factores:

HONGO
METAL

Número de casos completos: 24

Cuadro 3.5.1: Análisis de Varianza para % RETENIDO - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
A:HONGO	19084.2	3	6361.39	24.22	0.0000
B:METAL	4668.64	2	2334.32	8.89	0.0021
RESIDUOS	4727.65	18	262.647		
TOTAL (CORREGIDO)	28480.5	23			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

De los resultados obtenidos en este análisis de variable multifactorial, se observa que el valor -P es menor a 0,05, lo que indica que existe diferencias significativa estadística entre los cuatro tipos de hongos estudiados.

También indica que a nivel de la variable metal, los tres metales son retenidos en diferentes formas es decir existen diferencias significativas entre metal y metal, estos mismo resultados confirman en análisis individual realizado.

Cuadro 3.5.2: Pruebas de Múltiple Rangos para % RETENIDO por HONGO

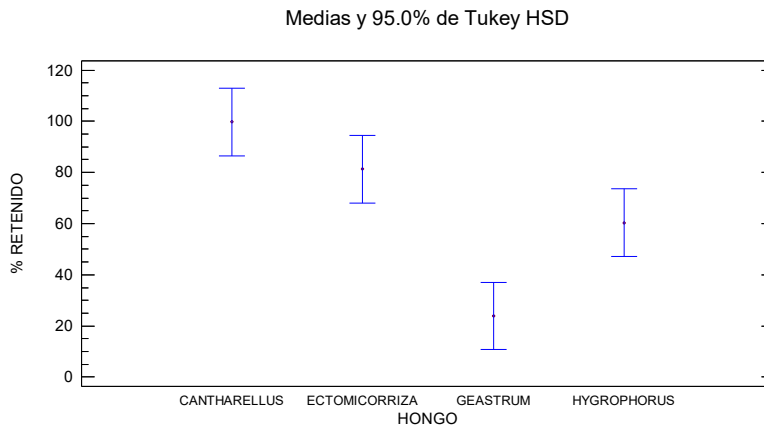
Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

HONGO	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
GEASTRUM	6	23.9095	6.61623	X
HYGROPHORUS	6	60.346	6.61623	X
ECTOMICORRIZA	6	81.3662	6.61623	X X
CANTHARELLUS	6	99.786	6.61623	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
CANTHARELLUS - ECTOMICORRIZA		18.4198	26.4552
CANTHARELLUS - GEASTRUM	*	75.8765	26.4552
CANTHARELLUS - HYGROPHORUS	*	39.44	26.4552
ECTOMICORRIZA - GEASTRUM	*	57.4567	26.4552
ECTOMICORRIZA - HYGROPHORUS		21.0202	26.4552
GEASTRUM - HYGROPHORUS	*	-36.4365	26.4552

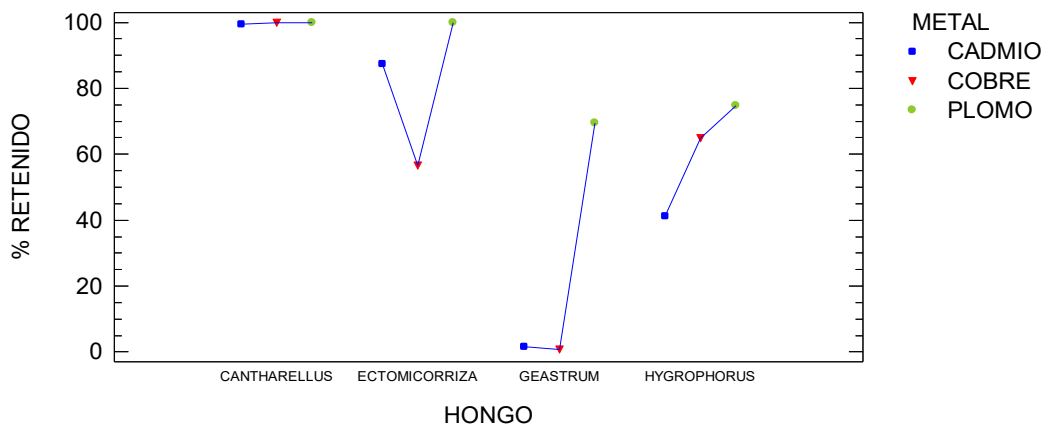
* indica una diferencia significativa.

Del cuadro 3.5.2, se desprende que existen tres grupos de hongos, lo que indica que hay diferencias entre ellos, coincidiendo con lo que indica el cuadro 3-5.1, estos resultados de las diferencias se observan mejor en el siguiente gráfico.

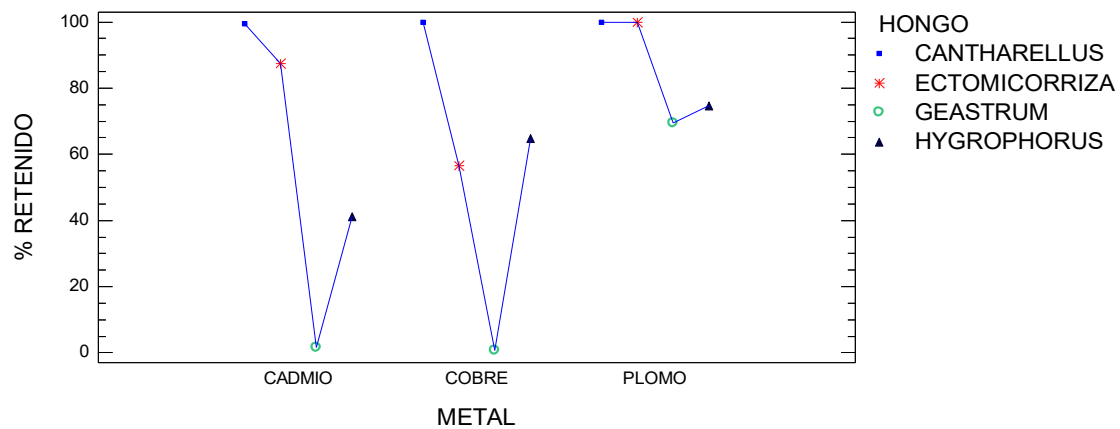


GRAFICOS MULTIVARIABLES $\alpha= 0.05$

GRAFICA MULTIVARIABLE PARA % DE METAL RETENIDO POR HONGO



GRAFICA MULTIVARIABLE PARA % DE METAL RETENIDO



ANEXO 4: EVALUACIÓN DE LA BIOMASA EN ESPECTROFOTOMETRÍA INFRAROJA FT-IR

Se realizó una evaluación en FT-IR a las biomásas secas de los basidiomicetos ya que éstas, aparte de tener ciertas características en su estructura (rigidez, porosidad, entre otras) presentan en composición química (grupos funcionales o sitios activos para la unión con los iones metálicos) que permiten la formación de fuertes enlaces con los iones metálicos. (Plaza, 2012).

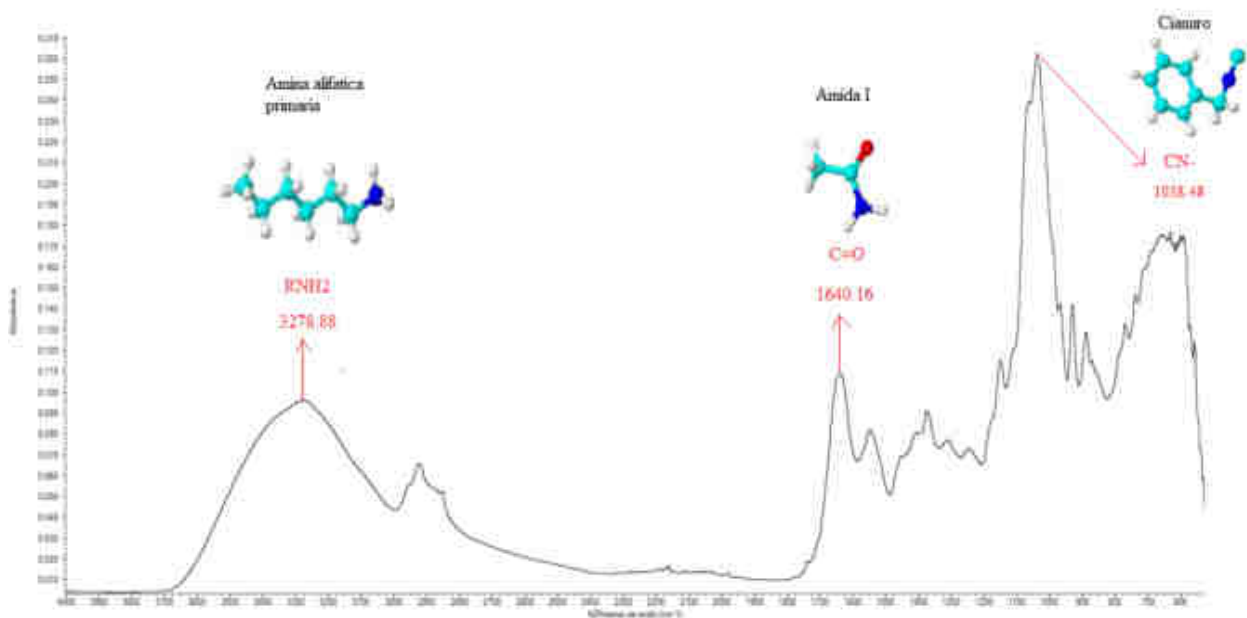


Figura 4.1: Espectro infra rojo (FT-IR) de la biomasa del basidiomiceto Geastrum

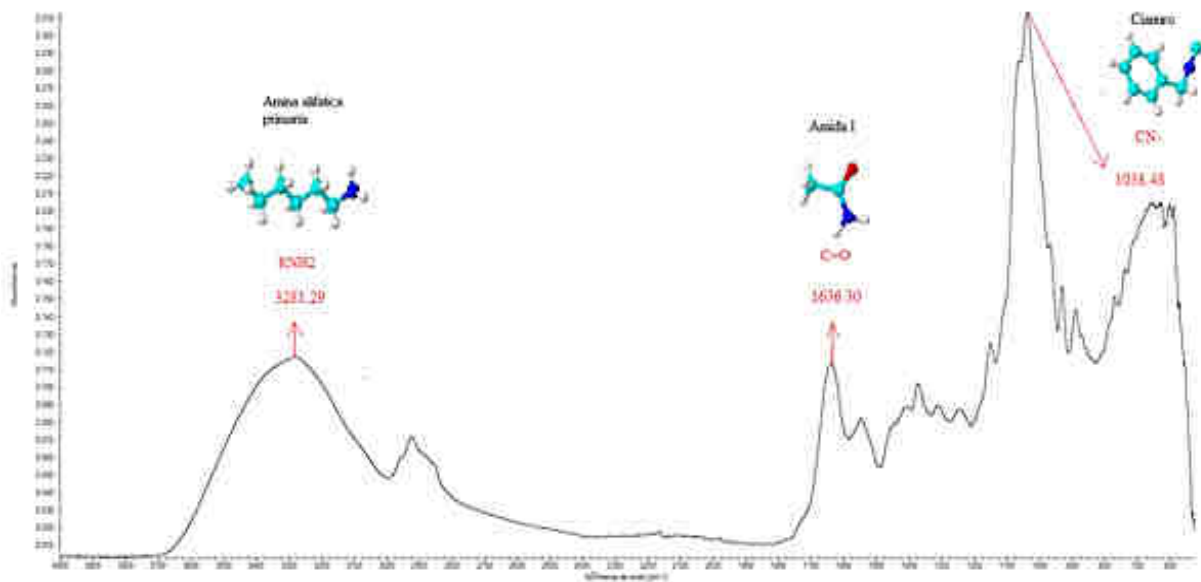


Figura4.2: Espectro infra rojo (FT-IR) de la biomasa de Hygrophorus

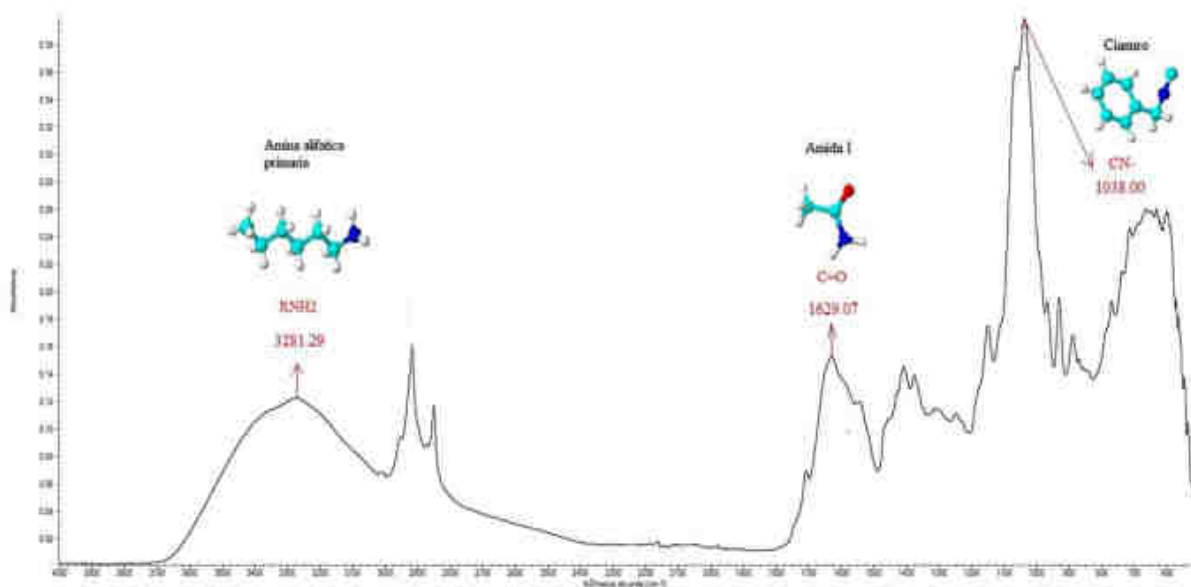


Figura4.3: Espectro infra rojo (FT-IR) de la biomasa de Cantharellus

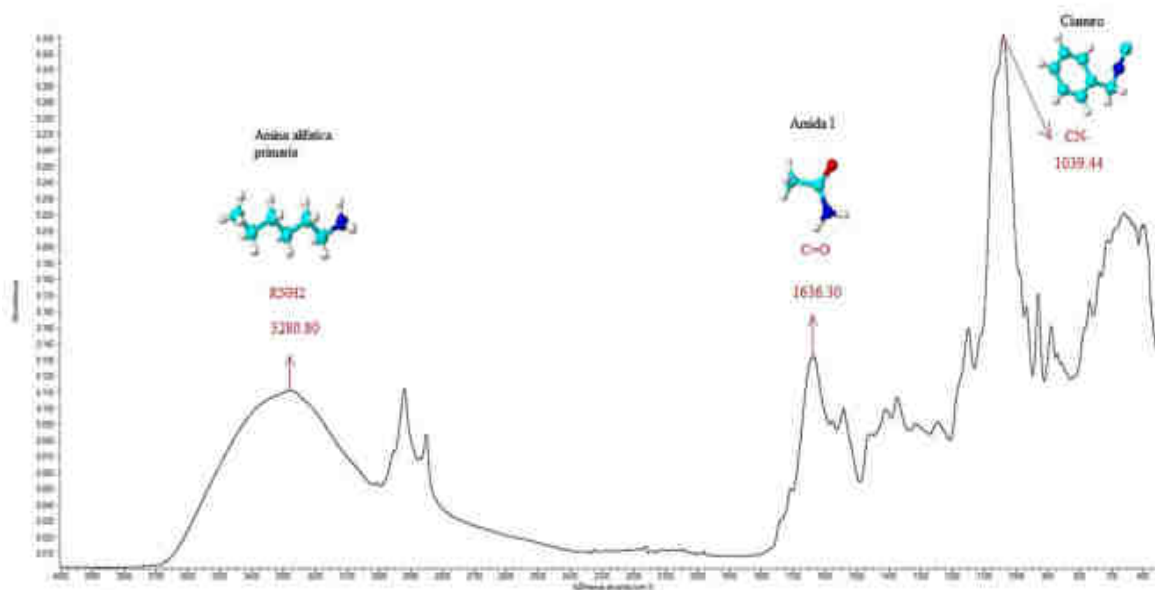


Figura 4.4: Espectro infra rojo (FT-IR) de la biomasa de Ectomicorriza

En la figura 4.1, 4.2, 4.3 y 4.4 se muestra los espectros de cada una de las biomazas, todas ellas según el análisis de FT-IR comparten los mismos ligandos estos son: Aminas alifáticas primaria (RNH_2) responsable de la retención de cobre y cadmio, Amidas I (CO) responsable de la retención de plomo y el Cianuro (CN^-) responsable de la retención de plomo.

Por otro lado, y como se mencionó anteriormente la biomasa seca presenta muchas propiedades que la hacen ideal como material biorremediante y, adicionalmente a ello el uso de biomasa muerta tiene ventajas económicas y de mantenimiento, el proceso de biosorción no se ve interrumpido por la muerte de la biomasa debido a las altas concentraciones de los contaminantes en el interior de la misma, como ocurre con la biomasa viva. (Tejada, Villabona, & Garcés , 2015)

ANEXO 5: CÁLCULOS DE CONCENTRACIÓN DE LA SOLUCIÓN PATRÓN DE METALES PESADOS Y LA CURVA PATRÓN

Se usó la fórmula de concentraciones:

$$V_1 * C_1 = V_2 * C_2$$

Donde:

V_1 : volumen inicial

C_1 : concentración inicial

V_2 : volumen final

C_2 : concentración final

$$V_1 = \frac{V_2 * C_2}{C_1}$$

Para la solución patrón:

$$V_1 = \frac{2000 \text{ ml} * 20 \text{ ppm}}{1000 \text{ ppm}} = 40 \text{ ml} = 40000 \text{ ul en } 2000 \text{ ml de agua ultrapura}$$

Para la curva patrón

- Para 20 ppm en 50 ml

$$V_1 = \frac{50 \text{ ml} * 20 \text{ ppm}}{1000 \text{ ppm}} = 1 \text{ ml} = 1000 \text{ ul en } 50 \text{ ml de agua ultrapura}$$

- Para 15 ppm en 50 ml

$$V_1 = \frac{50 \text{ ml} * 15 \text{ ppm}}{1000 \text{ ppm}} = 0.75 \text{ ml} = 750 \text{ ul en } 50 \text{ ml de agua ultrapura}$$

- Para 10 ppm en 50 ml

$$V_1 = \frac{50 \text{ ml} * 10 \text{ ppm}}{1000 \text{ ppm}} = 0.50 \text{ ml} = 500 \text{ ul en } 50 \text{ ml de agua ultrapura}$$

- Para 5 ppm en 50 ml

$$V_1 = \frac{50 \text{ ml} * 5 \text{ ppm}}{1000 \text{ ppm}} = 0.250 \text{ ml} = 250 \text{ ul en } 50 \text{ ml de agua ultrapura}$$

- Para 2 ppm en 50 ml

$$V_1 = \frac{50 \text{ ml} * 2 \text{ ppm}}{1000 \text{ ppm}} = 0.10 \text{ ml} = 100 \text{ ul en } 50 \text{ ml de agua ultrapura}$$

- Para 0 ppm en 50 ml = 0 ppm en 50 ml de agua ultrapura

ANEXO 6: FORMULACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO Y EL CALDO PARA INOCULADO

6.1. FORMULACIÓN PARA EL AGAR PAPA DEXTROSA – POTATO DEXTROSE

AGAR (PDA), como medio de cultivo para el crecimiento de cepas de los basidiomicetos.

Fórmula / Litro

Infusión de Papa a partir de 200 g.....4 g*

Dextrosa (Dextrose).....20 g

Agar.....15 g

4 g* de extracto de papa es equivalente a 200 g de infusión de papas.

pH Final: $5,6 \pm 0,2$ a 25°C

Procedimiento de Preparación

1. Pesar cada uno de los componentes según la formulación y suspenderlo en un litro de agua estéril.
2. Calentar la mezcla agitándolo constantemente para disolver completamente el medio.
3. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos.

Características del producto

El medio preparado presenta una apariencia de trazas de niebla a levemente nublado, y de color pálido a amarillo claro.

6.2. FORMULACIÓN PARA CALDO AGAR SABORAUD DEXTROSA, como medio de inoculado para la producción de biomasa.

Composición

Dextrosa.....	40.0 g
Peptona mixtura.....	10.0 g
Bacteriological.....	15.0 g

Fórmula / Litro

30 g/L agua

pH final 5,6 ± 0,2

Procedimiento de preparación

1. Suspender 30 g de polvo en 1 litro de agua estéril, y reposar 5 minutos.
2. Calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición para disolución total.
3. Distribuir en recipientes apropiados y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Características del producto

Color beige claro, homogéneo.

Almacenamiento

A 2-8 °C

ANEXO 7: FOTOGRAFÍAS RELACIONADAS A LA BIORREMEDIACIÓN EN LA PRESENTE INVESTIGACIÓN.



Imagen 7.1: Vista aérea del lugar de extracción de los basidiomicetos en la laguna Ankasq'ochaen el Saltuario Nacional del Ampay.



Imagen 7.2: Laguna Ankasq'ochaen el Saltuario Nacional del Ampay.



Imagen 7.3: Inoculado del caldo Saboraud con cepa de basidiomiceto



Imagen 7.4: Secado de la biomasa en estufa.



Imagen 7.5: Muestras de las biomásas secas molidas.



Imagen 7.6: Molino analítico usado utilizado para moler la biomasa seca.

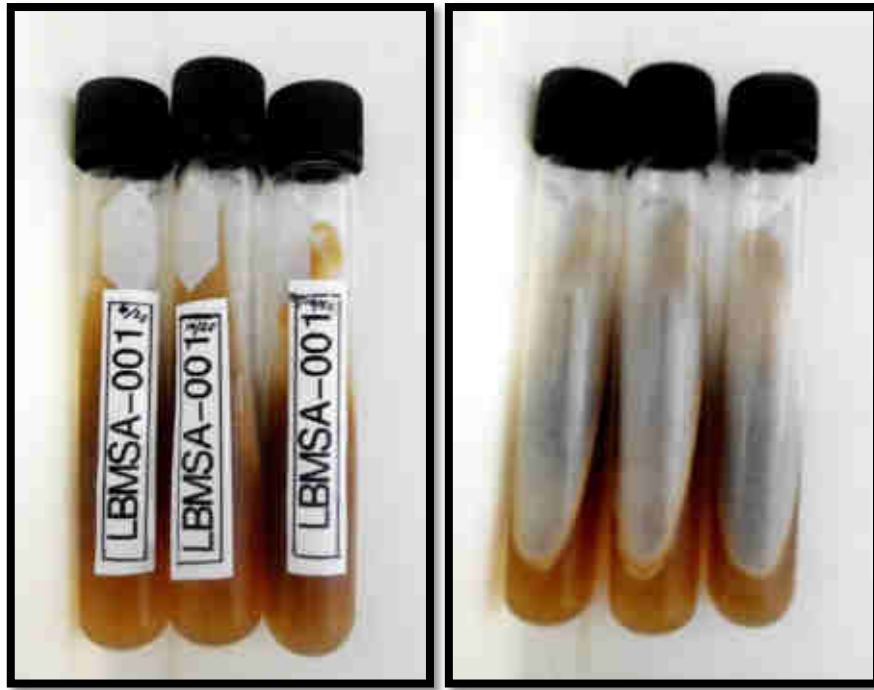


Imagen 7.7: Cepa del basidiomiceto MSA-001(Hectomicorriza) que forma parte del cepario.



Imagen 7.8: Cepa del basidiomiceto BSA-002(Geastrum) que forma parte del cepario.



Imagen 7.9: Cepa del basidiomiceto BSA-004(*Hygrophorus*) que forma parte del cepario.



Imagen 7.10: Cepa del basidiomiceto BSA-007(*Cantharellus*) que forma parte del cepario.



Imagen 7.11: Equipo de espectrofotometría de absorción atómica usado para el análisis de metales pesados.