

## Degradación de diésel por sustrato residual de *Agaricus bisporus* a nivel microcosmos

Amparo Mauricio-Gutiérrez<sup>1</sup>  
Teresita Jiménez-Salgado<sup>2</sup>  
Armando Tapia-Hernández<sup>2</sup>  
Omar Romero-Arenas<sup>2§</sup>

<sup>1</sup>CONACYT-Instituto de Ciencias-Posgrado en Ciencias Ambientales-Instituto de Ciencias-Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, Puebla, México. AP. 1622. CP. 72570. (amg2510@hotmail.com; terjimensal@yahoo.com.mx). <sup>2</sup>Centro de Agroecología-ICUAP-Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Edificio VAL 1, carretera a San Baltazar Tetela-San Pedro Zacachimalpa km 1.7, Puebla, México. CP. 72960.

§Autor para correspondencia: biol.ora@hotmail.com.

### Resumen

En México existen extensas áreas de suelos contaminados por hidrocarburos, provocando un perjuicio económico y social para la producción agrícola, en este sentido, surge la necesidad de buscar alternativas económicas que permitan contribuir con la recuperación de suelos agrícolas afectados. El presente trabajo tuvo como objetivo determinar la biodegradación de diésel en un suelo agrícola utilizando sustratos residuales (SR) de *Agaricus bisporus*. Se utilizó suelo contaminado a 7 039 ppm de diésel con diferentes dosis de SR, incubados por 28 días a 37 °C. Se determinó la producción de CO<sub>2</sub>, biodegradación de diésel, población inicial y final de hongos, así como actividad enzimática específica de lacasas inicial y final. En todos los tratamientos aumentó la remoción significativamente ( $p= 0.001$ ) a 37 °C, así como las tasas de producción de CO<sub>2</sub>. El tratamiento T4 presentó el mayor porcentaje de biodegradación de diésel (68.747%) y una producción acumulativa final de  $6.144 \times 10^{-4}$  mmol CO<sub>2</sub> m<sup>-3</sup>. La actividad de lacasas y poblaciones de hongos tolerantes disminuyeron en todos los tratamientos; además las bacterias aumentaron de 7.6 a 8.9 log UFC g<sub>ss</sub><sup>-1</sup>. Por lo que la actividad de biodegradación de diésel se atribuye a una bioaumentación y bioestimulación por parte del sustrato residual de *A. bisporus*.

**Palabras clave:** actividad enzimática, biodegradación, bioaumentación, bioestimulación.

Recibido: enero de 2022

Aceptado: marzo de 2022

## Introducción

La agricultura en México es una de las principales actividades primarias que contribuye con 2.3% del producto interno bruto (PIB) (INEGI, 2020). El municipio de Acatzingo, Puebla-México es uno de los principales productores agrícolas de cultivos como: maíz, frijol, alfalfa, col, lechuga, nopales, tomate, tuna y zanahoria principalmente (SIAP, 2021). Sin embargo, estas superficies agrícolas se han visto afectadas por el uso intensivo de fertilizantes y plaguicidas químicos, además por derrames de diésel, gasolina o petróleo crudo (Cavazos-Arroyo *et al.*, 2014). El deterioro ambiental con respecto a la degradación de suelos genera un costo de 0.41% del PIB (INEGI, 2018). El diésel es un contaminante que causa problemas a la salud por la presencia de compuestos de hidrocarburos poliaromáticos (HPA), que son considerados genotóxicos, mutagénicos y carcinogénicos (Schulte y Hauser, 2012). Por todo esto surge la necesidad de recuperar suelos agrícolas contaminados con diésel de esta región, debido a que es la fuente principal de subsistencia de los campesinos.

*Agaricus bisporus* ‘champiñón’ contribuye con 15% ( $34 \times 10^6$  t) de la producción mundial de hongos comestibles y es la cuarta especie más cultivada, principalmente por su sabor y propiedades nutrimentales, funcionales y medicinales (Royse *et al.*, 2017). En México, la producción de *A. bisporus* fue de 59 349 ton, representando 93.7% de la producción nacional de hongos, donde mantiene el liderazgo en Latinoamérica (Martínez-Carrera *et al.*, 2016). Durante el crecimiento y fructificación de *A. bisporus*, aproximadamente 44% de celulosa, 29% de xilano y 8% de lignina, son degradados; sin embargo, existe 20 a 30% de los polisacáridos presentes en el sustrato que permanecen sin degradar; este cálculo no considera la conversión de sustrato en micelio vegetativo (Kapu *et al.*, 2012; Vos *et al.*, 2017) así, una parte significativa del sustrato pueden ser utilizado como sustrato residual o poscosecha (SR).

En promedio una planta productora genera 5 kg de sustratos residuales (Lau *et al.*, 2003) por cada kg de hongos cosechados, obteniendo hasta 24 t de sustrato residuales al mes (Singh *et al.*, 2011). El sustrato residual se ha estudiado como alimento animal (Kim *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2018), para la purificación y extracción de enzimas, para aplicaciones de producción de biogas, biocombustible o biorremediación (Phan y Sabaratnam, 2012; Wan y Li, 2012), ya que presenta altas concentraciones de nutrientes, microorganismos y enzimas (Ball y Jackson, 1995; Chiu *et al.*, 1998; González-Matute *et al.*, 2011; Kapu *et al.*, 2012). Por lo que esta investigación tuvo como objetivo evaluar el sustrato residual de *A. bisporus* en la biorremediación de un suelo agrícola contaminado con diésel a nivel microcosmos, permitiendo ofrecer una alternativa biotecnológica para la restauración de suelos agrícolas impactados con hidrocarburos.

## Materiales y métodos

Se realizó un muestreo de suelo agrícola no contaminado en Acatzingo, Puebla, México con las siguientes coordenadas geográficas 18° 57' 01" latitud norte y 97° 43' 40" longitud oeste. El sustrato residual de *Agaricus bisporus* utilizado en este estudio se obtuvo de productores locales de la ciudad de Puebla, México.

## **Caracterización física, química y microbiológica del suelo y del sustrato residual de *A. bisporus***

Se llevó a cabo la caracterización física y química del suelo agrícola y del sustrato residual de *A. bisporus* como se describe en la NOM-021-SEMARNAT-2000 (DOF, 2002). Para la caracterización microbiológica del suelo y del SR se realizaron diluciones seriadas y la técnica de cuenta en placa en medios de cultivo diferenciales para la cuantificación de poblaciones de bacterias, hongos, actinomicetos y bacterias tolerantes a diésel expresadas como  $\log_{10}$  UFC  $\text{g}_{\text{ss}}^{-1}$  (unidades formadoras de colonias/gramo de suelo seco).

La población bacteriana mesofílica fue cuantificada en medio agar nutritivo (Bioxon, México), los hongos en medio Agar de Papa Dextrosa (PDA), los actinomicetos en Agar Czapek Dox y las bacterias tolerantes a diésel en medio basal; este último con la siguiente preparación ( $\text{g L}^{-1}$ ):  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 1;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.409;  $\text{CaCl}_2$ , 0.02;  $\text{FeCl}_3$ , 0.00005; agar bacteriológico, 6.5; pH 7, suplementado con 100  $\mu\text{l}$  de diésel estéril distribuido sobre el agar gelificado (Mauricio-Gutiérrez *et al.*, 2014). Las bacterias mesofílicas, bacterias tolerantes y actinomicetos fueron incubados a 30 °C por 72 h, los hongos fueron incubados a 25 °C por 72 h.

### **Biodegradación de diésel a nivel microcosmos utilizando SR de *A. bisporus***

El suelo utilizado fue esterilizado y contaminado intencionalmente con 7 039 ppm de diésel, e intemperizado por tres meses. Se empleó un diseño experimental completamente al azar en sistema de microcosmos para evaluar la participación de las poblaciones microbianas y actividad lacasa (Lac) presente en el sistema de estudio con cuatro tratamientos con diferentes relaciones suelo: sustrato en base seca (T1 (95:5), T2 (90:10), T3 (85:15) y T4 (80:20)) y como testigos se utilizó el suelo contaminado (T0<sub>1</sub>) y SR (T0<sub>2</sub>).

Para cada tratamiento se emplearon frascos serológicos de 120 ml, con 30 g de la mezcla suelo-sustrato y fueron ajustados a la relación C:N:P a 100:10:1 usando soluciones estériles de  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  1N y  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1N. La humedad se mantuvo entre 23.8-25.6%  $\pm$ 5.23. La atmósfera de los frascos fue intercambiada cada tercer día con un flujo de aire (1.8  $\text{ml aire s}^{-1}$ ); a través, de una membrana estéril (0.22  $\mu\text{m}$ ), previamente se evaluó la cantidad de  $\text{CO}_2$  producida. Todos los tratamientos se incubaron por 28 días a dos temperaturas (25 y 37 °C).

Se determinó el porcentaje de biodegradación de diésel (%), densidad real por la NOM-021-SEMARNAT-2000, actividad inicial y final de lacasas (Lac), población inicial y final de bacterias y hongos tolerantes a diésel (DOF, 2002). Todos los tratamientos se llevaron a cabo por triplicado. El porcentaje de biodegradación fue determinado de acuerdo con la siguiente ecuación: porcentaje de biodegradación =  $[(A-B)/A] \cdot 100$ , donde: A = concentración inicial de diésel; B = concentración final de diésel

### **Respiración basal**

El  $\text{CO}_2$  producido por el suelo durante 24 h fue cuantificado y absorbido por 5 ml de NaOH 0.1 N, se calculó a través de la titulación con HCl 0.1 N utilizando fenolftaleína, previamente se precipitó el exceso de carbonatos con 5 ml de  $\text{BaCl}_2$  0.5 N (Rivera-Espinoza y Dendooven, 2004).

## Cuantificación de diésel

Se cuantificó el diésel inicial y residual con base al Método EPA 8015 C (Nonhalogenated Organics by Gas Chromatography) empleando un GC-MS con una columna capilar HP-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu\text{m}$ ), cuyo flujo inicial fue de 1 ml  $\text{min}^{-1}$ . Las condiciones de análisis del horno fueron: temperatura inicial 50 °C, Temperatura máxima 300 °C.

## Cuantificación de enzimas

Se realizó una extracción al inicio y final del experimento de la muestra del SR de *A. bisporus* y de los diferentes tratamientos en relaciones suelo: sustrato (5 g) con 20 ml de buffer de acetato de sodio (50 mM, pH 5) por 2 h a 80 rev  $\text{min}^{-1}$  y a 4 °C, posteriormente se filtró a través de papel Whatman No. 1. Los extractos se almacenaron a 4 °C para la determinación de Lacasas (Isikhuemhen y Mikiashvilli, 2009). La actividad fue determinada por oxidación de 2,2'-azinobis, 3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonate (ABTS) a 25 °C y leída a 420 nm ( $\epsilon_{420} = 36\,000 \text{ mM cm}^{-1}$ ), la actividad enzimática fue reportada como actividad específica (U g suelo $^{-1}$ ) (Bollag y Leonowicz, 1984; Gayosso-Canales *et al.*, 2011).

## Análisis microbiológico

La cuantificación de la población inicial y final de bacterias y hongos tolerantes a diésel fue por conteo directo en placa. La determinación de bacterias se realizó para los tratamientos incubados a 37 °C crecidos en medio basal mencionado anteriormente. La determinación de hongos fue para los tratamientos incubados a 25 °C y se utilizó el medio basal con la siguiente composición química (g L $^{-1}$ ): (NH $_4$ ) $_2$ SO $_4$ , 7; K $_2$ HPO $_4$ , 1; KH $_2$ PO $_4$ , 1; MgSO $_4$ 7H $_2$ O, 0.409; dextrosa, 0.1; Sol. E 100x, 100  $\mu\text{l}$ ; rosa de bengala, 0.05; sulfato de estreptomycin, 0.05; pH 5.5. Se empleó como fuente de carbono diésel previamente esterilizado por filtración, agregando 100  $\mu\text{l}$  sobre la placa Petri (Mauricio-Gutiérrez *et al.*, 2014). Los microorganismos fueron reportados como log $_{10}$  UFC g $_{\text{ss}}^{-1}$  (unidades formadoras de colonias/gramo de suelo seco).

## Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza para comparar los diferentes tratamientos y una prueba de comparación múltiple de medias de Tukey ( $p < 0.05$ ) utilizando el paquete estadístico Minitab Versión 17.3.

## Resultados y discusión

El sustrato residual (SR) derivado de la industria de hongos comestibles representan un problema ambiental (Phan y Sabaratnam, 2012), en Europa se generan 3.5 x 10 $^6$  t al año (García-Delgado *et al.*, 2013). México contribuye con la generación de estos residuos, ya que es el mayor productor de hongos comestibles en Latinoamérica, siendo *A. bisporus* uno de los principales hongos cultivados (Martínez-Carrera *et al.*, 2016). Por tales motivos, los SR se han estudiado para diferentes aplicaciones como la biorremediación de suelos contaminados con HPA (Cerniglia y Sutherland, 2010; Stabnikova *et al.*, 2010; Pardo-Giménez *et al.*, 2010; Upadhyay y Singh, 2011; Phan y Sabaratnam, 2012; García-Delgado *et al.*, 2013).

## Caracterización física, química y microbiológica del suelo y del SR

De acuerdo con las características físicas y químicas (Cuadro 1) del suelo agrícola de Acatzingo, Puebla, México fue clasificado como franco-arenoso, con valores bajos de humedad (17.35%), materia orgánica (2.04%), nitrógeno total (0.032%) y fósforo (0.003%) comparados con los parámetros del SR (190.32%, 57.62%, 1.46% y 0.79% respectivamente). Además, presentó un valor de pH medianamente alcalino (pH= 8.01). Los SR de *Agaricus bisporus* se caracterizan por presentar altas concentraciones de nutrientes, estas propiedades han sido utilizadas como agentes bioestimulantes para la biorremediación de xenobiótico ya que presentan altas dosis de nitrógeno (2.16%), fósforo (0.69%) y carbono (54.3%) (Corral-Bobadilla *et al.*, 2019).

**Cuadro 1. Caracterización física, química y microbiológica del suelo y del SR de *A. bisporus*.**

Parámetros	Suelo	Sustrato residual
pH	8.01	7.26
CE ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	205	Nd
Textura (%) [arcilla, limo, arena]	17.4, 18, 64.6	Nd
Humedad (%)	17.355	190.328
Materia orgánica total (%)	2.04	57.625
Nitrógeno total (%)	0.032	1.46
Fósforo disponible (%)	0.003	0.791
Densidad real ( $\text{g ml}^{-1}$ )	2.464	Nd
Bacterias ( $\log \text{UFC g}_{\text{ss}}^{-1}$ )	6.021	7.708
Hongos ( $\log \text{UFC g}_{\text{ss}}^{-1}$ )	3.455	5.554
Actinomicetos ( $\log \text{UFC g}_{\text{ss}}^{-1}$ )	2.895	3.559
Bacterias hidrocarbonoclastas ( $\log \text{UFC g}_{\text{ss}}^{-1}$ )	5.037	3.828

Nd= no determinado;  $\text{g}_{\text{ss}}$ = gramos de suelo seco.

Con respecto a la cuantificación de microorganismos cultivables del Cuadro 1, la población bacteriana presentó los valores más altos en el suelo ( $6.021 \log \text{UFC g}_{\text{ss}}^{-1}$ ) y el SR ( $7.708 \log \text{UFC g}_{\text{ss}}^{-1}$ ). El tamaño de las otras poblaciones microbianas varió entre las muestras, siendo el suelo agrícola donde hubo una mayor cantidad de bacterias hidrocarbonoclastas ( $5.037 \log \text{UFC g}_{\text{ss}}^{-1}$ ), seguido de la población fúngica ( $3.455 \log \text{UFC g}_{\text{ss}}^{-1}$ ) y finalmente actinomicetos ( $2.895 \log \text{UFC g}_{\text{ss}}^{-1}$ ). Sin embargo, en el SR hubo una mayor cantidad de hongos ( $5.554 \log \text{UFC g}_{\text{ss}}^{-1}$ ) y los grupos de actinomicetos y bacterias hidrocarbonoclastas se mantuvieron en el mismo orden de magnitud ( $3.559$  y  $3.828 \log \text{UFC g}_{\text{ss}}^{-1}$ ). El suelo y el SR alberga población microbiana autóctona, estos últimos han utilizados como fuentes de bioaumentación para procesos de biorremediación (Wang *et al.*, 2016; Leong *et al.*, 2022).

## Biodegradación de diésel a nivel microcosmos utilizando SR de *A. bisporus*

Los experimentos de biodegradación de diésel a nivel microcosmos Cuadro 2, presentaron una mayor biodegradación a 37 °C; el tratamiento T4 fue el que obtuvo la mayor remoción (68.747%) seguido de T4 a 25 °C (61.261%) y T3 a 37 °C (60.14%). Por el contrario, los tratamientos con

menor porcentaje de remoción fueron el T0<sub>1</sub> (suelo contaminado) a 25 °C con una remoción de 20.603%, seguido del T1 (27.034%) y el T2 (29.791%) a 25 °C, presentando diferencias estadísticas altamente significativas ( $p= 0.001$ ).

**Cuadro 2. Biodegradación de diésel y producción de CO<sub>2</sub> acumulativo usando SR de *A. bisporus*.**

Tratamiento	Biodegradación		mmol CO <sub>2</sub> m <sup>-3</sup> día *	
	25 °C	37 °C	25 °C	37 °C
	(%)		(x10 <sup>-4</sup> )	
T1	27.034 c	40.966 bc	4.319 ±0.287 c	5.608 ±0.533 b
T2	29.791 c	48.408 b	4.343 ±0.266 c	5.685 ±0.564 b
T3	37.177 b	60.14 a	4.808 ±0.574 b	6.014 ±0.214 a
T4	61.261 a	68.747 a	5.785 ±0.46 a	6.144 ±0.429 a
T0 <sub>1</sub>	20.603 d	37.357 c	4.902 ±0.334 b	5.432 ±0.346 b
T0 <sub>2</sub>	Nd	Nd	6.173 ±0.245 a	5.767 ±0 b

\*= ±desviación estándar; Nd= no detectado. Letras diferentes en la columna indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba Tukey ( $p= 0.05$ ).

La generación de CO<sub>2</sub> acumulativa y cuantificada en el sistema de estudio indicó que los tratamientos incubados a 37 °C produjeron una mayor concentración (mmol CO<sub>2</sub> m<sup>-3</sup> día) Cuadro 2. Los tratamientos que obtuvieron mayor producción de CO<sub>2</sub> fueron el T0<sub>2</sub> (SR) (6.173 x 10<sup>-4</sup> mmol CO<sub>2</sub> m<sup>-3</sup> día) a 25 °C, T4 (6.144 x 10<sup>-4</sup> mmol CO<sub>2</sub> m<sup>-3</sup> día) y T3 (6.014 x 10<sup>-4</sup> mmol CO<sub>2</sub> m<sup>-3</sup> día) a 37 °C. Y los tratamientos: T1 (4.319 x 10<sup>-4</sup> mmol CO<sub>2</sub> m<sup>-3</sup> día) a 25 °C, T2 (4.343 x 10<sup>-4</sup> mmol CO<sub>2</sub> m<sup>-3</sup> día), T3 (4.808 x 10<sup>-4</sup> mmol CO<sub>2</sub> m<sup>-3</sup> día) y T0<sub>1</sub> (suelo contaminado) (4.902 x 10<sup>-4</sup> mmol CO<sub>2</sub> m<sup>-3</sup> día) a 25 °C presentaron menor tasa de producción de CO<sub>2</sub>. Margesin *et al.* (2007) correlacionaron positivamente la degradación de hidrocarburos con la actividad y biomasa microbiana, resultados similares a los obtenidos en la presente investigación.

Una relación 4:1 de suelo: sustrato (T4) biodegradó el 68.747% de diésel en 28 días, lo que permite tratar 6.92 t m<sup>-3</sup> de suelo, como lo mencionan Sasek *et al.* (2003) quienes adicionaron SR de *A. bisporus* a una relación 4:1 (suelo: sustrato) y obtuvieron una degradación de 68.8% de HPA (hidrocarburos poliaromáticos) al término de 154 días en 2.8 m<sup>3</sup> de suelo. Mientras, Mohammadi-Sichani *et al.* (2019) reportaron una degradación de 71.5% en tres meses de HTP (hidrocarburos totales de petróleo) en suelo, aplicando 10% de SR de *A. bisporus*. Además, se determinó la densidad real de cada tratamiento con la finalidad de valorar el SR de *A. bisporus* como agente texturizante para su aplicación en biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

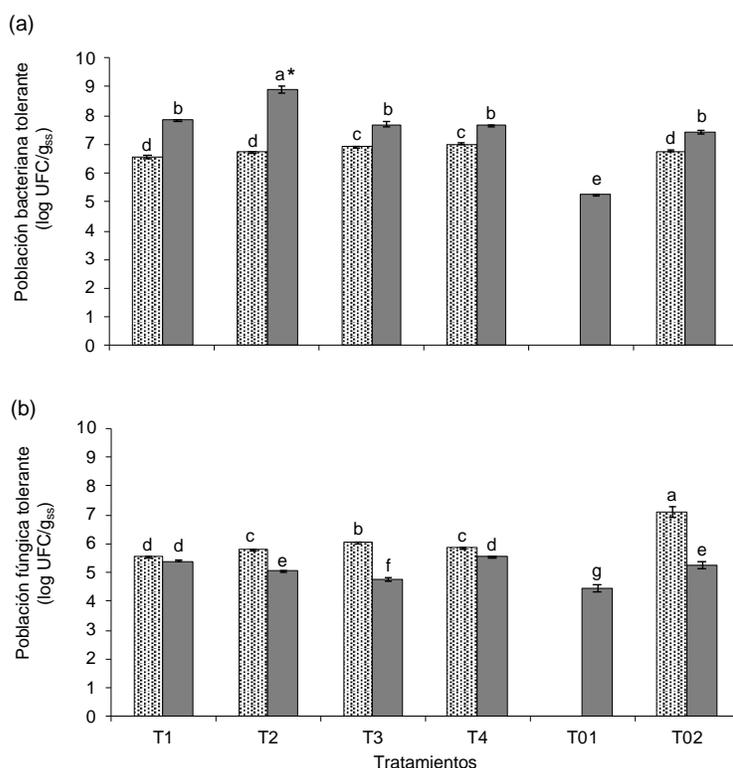
Los resultados obtenidos indicaron que no existe diferencia estadística significativa de la densidad real entre los tratamientos, donde los valores están en el intervalo de 2.36 a 2.536 g ml<sup>-1</sup> Cuadro 3. Los porcentajes de biodegradación obtenidos se pueden deber a las propiedades físicas y químicas que aporta el SR al suelo como: textura, capacidad de retención de agua, porosidad y aportación de nutrientes esenciales como nitrógeno y fósforo (Cuadro 1), que permiten estimular la actividad microbiana degradativa ayudando en la bioremediación del suelo (Stabnikova *et al.*, 2010; García-Delgado *et al.*, 2013).

**Cuadro 3. Densidad real y cantidad de suelo contaminado tratado por SR de *A. bisporus* aplicado.**

Tratamiento	Densidad real	Suelo tratado/sustrato residual
	(g ml <sup>-1</sup> )	(t m <sup>-3</sup> )
T1	2.536 a	32.85
T2	2.413 a	15.56
T3	2.43 a	9.76
T4	2.36 a	6.92
T0 <sub>1</sub>	2.334 a	Na
T0 <sub>2</sub>	1.729 b	Na

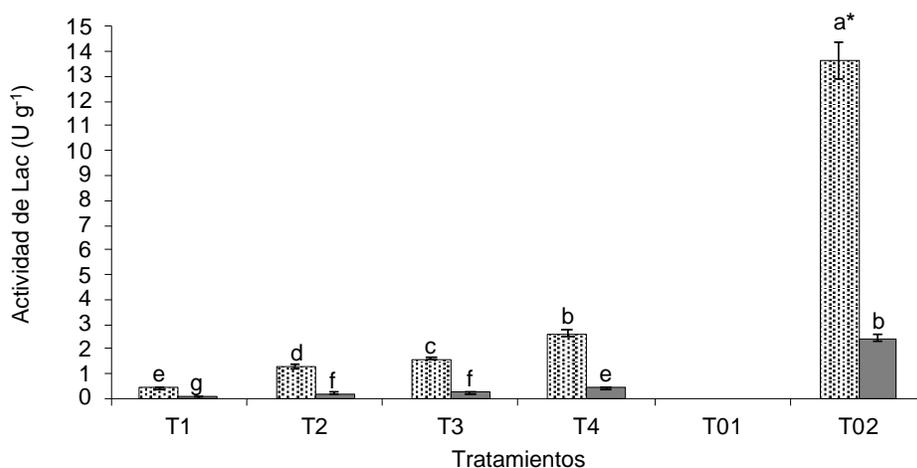
Letras diferentes en la columna indican diferencias estadísticas significativas de acuerdo con la prueba Tukey ( $p=0.05$ ); Na= no aplica.

La dinámica poblacional de bacterias tolerantes a diésel en el sistema de estudio indicó un aumento estadístico significativo ( $p=0.001$ ) al final del experimento para todos los tratamientos: T1 (7.83 log UFC g<sub>ss</sub><sup>-1</sup>), T2 (8.9 log UFC g<sub>ss</sub><sup>-1</sup>), T3 (7.7 log UFC g<sub>ss</sub><sup>-1</sup>) y T4 (7.6 log UFC g<sub>ss</sub><sup>-1</sup>). Sin embargo, el conteo poblacional de hongos tolerantes mostró una disminución estadística significativa ( $p=0.001$ ) con tamaño de poblaciones de 4.8 a 5.6 log UFC g<sub>ss</sub><sup>-1</sup> (Figura 1).



**Figura 1. a) dinámica poblacional bacteriana de los tratamientos incubados a 37 °C; y b) fúngica de los tratamientos incubados a 25 °C tolerantes a diésel.** Al inicio (barras claras) y final (barras oscuras) del experimento con diferentes relaciones suelo: SR de *A. bisporus* en base seca. Cada valor representa el promedio de triplicados. Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ( $p=0.05$ ) de acuerdo con la prueba Tukey.

La cuantificación de Lac disminuyó significativamente ( $p=0$ ) en los tratamientos incubados a 25 °C cuantificándose actividades enzimáticas específicas de 0.083 a 0.48 U g<sup>-1</sup> (Figura 2). El tratamiento T4 (80:20) presentó la mayor actividad enzimática (0.48 U g<sup>-1</sup>) a diferencia del grupo testigo T0<sub>2</sub> (SR) de *A. bisporus* (2.46 U g<sup>-1</sup>). En los tratamientos incubados a 37 °C no se detectó la actividad de Lac de acuerdo con la metodología establecida.



**Figura 2. Actividad de lacasas a nivel microcosmos con diferentes relaciones suelo: SR de *A. bisporus* en base seca.** Cada valor representa el promedio de triplicados de los tratamientos al inicio (barras claras) y final (barras oscuras) del experimento. \*= letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ( $p=0.05$ ) de acuerdo con la prueba Tukey.

El grupo de microorganismos estudiados en la biodegradación de diésel fueron las bacterias tolerantes autóctonas del SR y del suelo, ya que presentaron una efectiva en la biodegradación y contribuyeron en el proceso de biorremediación (Gallego *et al.*, 2001). Por el contrario, los tratamientos incubados a 25 °C mostraron una disminución de la población de hongos ya que fueron afectados por las condiciones del microcosmos (ambiente) y el tipo de contaminante empleado, así como en la producción de enzimas como las Lac. Bento *et al.* (2005) mencionan que los microorganismos en un ambiente hostil disminuyen su actividad metabólica y limitan el crecimiento de su población.

Aunque existen diferentes reportes de enzimas extracelulares secretadas por *A. bisporus* en el SR que pueden ser aprovechadas en procesos de biorremediación (García-Delgado *et al.*, 2013; Chatterjee *et al.*, 2017). Es importante mencionar, que el tratamiento testigo T0<sub>1</sub> (suelo) presentó una biodegradación de diésel de 37.357%, este valor puede estar asociado a la pérdida por volatilización ya que puede ser de 35-40% en suelo (Rhykerd *et al.*, 1999; Saviozzi *et al.*, 2009) y a la presencia de estructuras reproductivas de la microbiota autóctona que resistió la esterilización del suelo (Sylvia *et al.*, 1999), ya que en el presente estudio el T0<sub>1</sub> (suelo) presentó poblaciones de bacterias y hongos finales de 5.3 y 4.4 log UFC g<sub>ss</sub><sup>-1</sup>.

El SR de *A. bisporus* se caracterizó como agente bioestimulante por presentar nutrientes orgánicos, además aumentó la porosidad del suelo contaminado mejorando la difusión de oxígeno y la capacidad de retención de agua. También presentó características de bioaumentación, ya que aportó carga microbiana como fuente degradadora de diésel con un efecto potencial en la biodegradación

de hidrocarburos. Como lo establecen Chiu *et al.* (1998) donde mencionan que los SR presentan la ventaja de degradar compuestos xenobióticos por el consorcio de enzimas de diversos microorganismos, además de ser relativamente ricos en nutrientes que estimulan a estos microorganismos en la secreción de enzimas sin tener alguna limitación nutrimental.

En este contexto, existen diversos estudios donde evalúan diferentes SR como: lodos activados, bagazo de caña de azúcar, cachaza de caña de azúcar y residuos de maíz para fines de biorremediación de suelos contaminados con diésel con porcentajes de biodegradación de 61 al 90% en un tiempo de 15 a 109 días, resultados similares a los obtenidos en la presente investigación (Gallego *et al.*, 2001; Molina-Barahona *et al.*, 2004; Rivera-Espinoza y Dendooven, 2004; Bento *et al.*, 2005; García-Torres *et al.*, 2011).

## Conclusiones

Esta investigación identificó un uso alternativo del SR de *A. bisporus* para la biorremediación de suelos agrícolas contaminados con diésel, atribuyendo a la actividad bacteriana autóctona del SR y del suelo esta biodegradación; además, el SR fue una fuente importante de nutrientes. Por lo que se requieren estudios posteriores sobre los microorganismos y rutas de biodegradación involucradas, para su aplicación a pequeña escala e industrial bajo condiciones reales en ensayos de campo.

## Agradecimientos

Los autores(a) agradecen a SEP-PRODEP. Este trabajo fue parcialmente soportado por el programa cátedra-CONACYT y SEP-PRODEP.

## Literatura citada

- Ball, A. and Jackson, A. 1995. The recovery of lignocellulose-degrading enzymes from spent mushroom compost. *Bioresour Technol.* 54(3):311-314.
- Bento, F.; Camargo, F.; Okeke, B. and Frankenberger, W. 2005. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresour. Technol.* 96(9):1049-1055. Doi: 10.1016/j.biortech.2004.09.008.
- Bollag, J. and Leonowicz, A. 1984. Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Appl. Environ. Microbiol.* 48(4):849-854.
- Cavazos-Arroyo, J.; Pérez-Armendáriz, B. y Mauricio-Gutiérrez, A. 2014. Afectaciones y consecuencias de los derrames de hidrocarburos en suelos agrícolas de Acatzingo Puebla, México. *Agríc. Soc. Des.* 11(4):539-550.
- Cerniglia, C. E. and Sutherland, J. B. 2010. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. *In: Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology.* Timmis, K.N. (ed.). 1. Springer. Berlin, Heidelberg. 2079-2110 pp. Doi: 10.1007/978-3-540-77587-4-151.
- Chatterjee, S.; Sarma, M.; Deb, U.; Steinhäuser, G.; Walther, C. and Gupta, D. 2017. Mushrooms: from nutrition to mycoremediation. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24(24):19480-19493. Doi: 10.1007/s11356-017-9826-3.

- Chiu, S. W.; Ching, M. L.; Fong, K. and Moore, D. 1998. Spent oyster mushrooms substrate performs better than many mushroom mycelia in removing the biocide pentachlorophenol. *Mycol Res.* 102(12):1553-1562. Doi: 10.1017/S0953756298007588.
- Corral-Bobadilla, M.; González-Marcos, A.; Vergara-González, E. P. and Alba-Elías, F. 2019. Bioremediation of wastewater to remove heavy metals using the spent mushroom substrate of *Abaricus bisporus*. *Water.* 11(454):1-15. Doi: 10.3390/w11030454.
- DOF. 2002. Official Journal of the Federation. NOM-021-RECNAT-2000, Official mexican standard, which establishes the specifications of fertility, salinity and soil classification, studies, sampling and analysis.
- Gallego, L. R.; Loredó, J.; Llamas, J. F.; Vázquez, F. and Sánchez, J. 2001. Bioremediation of diesel-contaminated soils: evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. *Biodegradation.* 12(5):325-335. Doi: 10.1023/A:1014397732435.
- García-Delgado, C.; Jiménez-Ayuso, N.; Frutos, I.; Gárate, A. and Eymar, E. 2013. Cadmium and lead bioavailability and their effects on polycyclic aromatic hydrocarbons biodegradation by spent mushroom substrate. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20(12):8690-8699. Doi: 10.1007/s11356-013-1829-0.
- García-Torres, R.; Ríos-Leal, E.; Martínez-Toledo, A., Ramos-Morales, F. R.; Cruz-Sánchez, J. S. y Cuevas-Díaz, M. 2011. Uso de cachaza y bagazo de caña de azúcar en la remoción de hidrocarburos en suelo contaminado. *Rev. Intern. Contamin. Amb.* 27(1):31-39.
- Gayosso-Canales, M.; Esparza-García, F. J.; Bermúdez-Cruz, R. M.; Tomasini, A.; Ruíz-Aguilar, G. M. and Rodríguez-Vázquez, R. 2011. Application of 2III7-3 fractional factorial experimental design to enhance enzymatic activities of *Pleurotus ostreatus* with high concentrations of polychlorinated by phenyls. *J. Environ. Sci. Health A.* 46(3):298-305. Doi: 10.1080/10934529.2011.539095.
- González-Matute, R.; Figlas, D. and Curvetto, N. 2011. *Agaricus blazei* production on non-composted substrates based on sunflower seed hulls and spent oyster mushroom substrate. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27(6):1331-1339. Doi: 10.1007/s11274-010-0582-5.
- INEGI. 2018. Sistema de cuentas nacionales de México. Cuentas económicas y ecológicas de México. 2003-2017.
- INEGI. 2020. PIB y cuentas nacionales. Producto interno bruto trimestral. Cifras desestacionalizadas por grupo de actividades económicas, base.
- Isikhuemhen, O. S. and Mikiashvili, N. A. 2009. Lignocellulolytic enzyme activity, substrate utilization, and mushroom yield by *Pleurotus ostreatus* cultivated on substrate containing anaerobic digester solids. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36(1):1353-1362. Doi: 10.1007/s10295-009-0620-1.
- Kapu, N. S.; Mannign, M.; Hurley, T. B.; Voigt, J.; Cosgrove, D. J. and Romaine C. 2012. Surfactant-assisted pretreatment and enzymatic hydrolysis of spent mushroom compost for the production of sugars. *Biores Technol.* 114(1):399-405. Doi: 10.1016/j.biortech.2012.02.139.
- Kim, M.; Lee, H.; Park, J.; Kang, S. and Choi, Y. 2011. Recycling of fermented sawdust-based oyster mushroom spent substrate as a feed supplement for postweaning calves. *Asian-aust J. Anim. Sci.* 24(4):493-499. Doi: 10.5713/ajas.2011.10333.
- Lau, K. L.; Tsang, Y. Y. and Chiu, S. 2003. Use of spent mushroom compost to bioremediate PAH-contaminated samples. *Chemosphere.* 52(9):1539-1546. Doi: 10.1016/S0045-6535(03)00493-4.

- Leong, Y. K.; Ma, T. W.; Chang, J. S. and Yang, F. C. 2022. Recent advances and future directions on the valorization of spent mushroom substrate (SMS): a review. *Bioresour. Technol.* 344:126-157. Doi: 10.1016/j.biortech.2021.126157.
- Li, S.; Li, D.; Li, J.; Li, Y.; Li, G.; Zang, B. and Li, Y. 2018. Effect of spent mushroom substrate as a bulking agent on gaseous emissions and compost quality during pig manure composting. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25(13):12398-12406. Doi: 10.1007/s11356-018-1450-3.
- Margesin, R.; Hämmerle, M. and Tscherko, D. 2007. Microbial activity and community composition during bioremediation of diesel-oil-contaminated soil: effects of hydrocarbon concentration, fertilizers and incubation time. *Microbial. Ecol.* 53(2):259-269. Doi: 10.1007/s00248-006-9136-7.
- Martínez-Carrera, D.; Larqué-Saavedra, A.; Tovar, P. A.; Torres, N.; Meneses, M. E.; Sobal, C. M.; Morales, A. P.; Bonilla, Q. M.; Escudero, U. H.; Tello-Salgado, I.; Bernabé-González, T.; Martínez, S. W. y Mayett, Y. 2016. Contribución de los hongos comestibles, funcionales y medicinales a la construcción de un paradigma sobre la producción, la dieta, la salud y la cultura en el sistema agroalimentario de México. *In: Martínez-Carrera, D. y Ramírez-Juárez, J. (Eds.). Ciencia, Tecnología e Innovación en el Sistema Agroalimentario de México. (Ed.) del Colegio de Posgraduados-AMC-CONACYT-UPAEP-IMINAP. San Luis Huexotla, Texcoco, Estado de México. 581-640 pp.*
- Mauricio-Gutiérrez, A.; Jiménez-Salgado, T.; Tapia-Hernández, A.; Cavazos-Arroyo, J. and Pérez-Armendáriz, B. 2014. Biodegradation of hydrocarbons exploiting spent substrate from *Pleurotus ostreatus* in agricultural soil. *Afr. J. Biotechnol.* 13(33):3385-3393. Doi: 10.5897/AJB2014.13964.
- Mohammadi-Sichani, M.; Assadi, M. M.; Farazmand, A.; Kianirad, M.; Ahadi, A. M. and Hadian-Ghahderijani, H. 2019. Ability of *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus* and *Ganoderma lucidum* compost in biodegradation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil. *Inter. J. Environ. Sci. Technol.* 16(5):2313-2320. Doi: 10.1007/s13762-017-1636-0.
- Molina-Barahona, L.; Rodríguez-Vázquez, R.; Hernández-Velasco, M.; Vega-Jarquín, C.; Zapata-Pérez, O.; Mendoza-Cantú, A. and Albores, A. 2004. Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. *Appl. Soil Ecol.* 27(2):165-175. Doi: 10.1016/j.apsoil.2004.04.002.
- Pardo-Giménez, A.; Cunha-Zied, D. and Pardo-González, J. 2010. Utilización de compost agotado de champiñón como capa de coberturas en nuevos ciclos de producción. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 45(10):1164-1171. doi: 10.1590/S0100-204X2010001000016.
- Phan, C. W. and Sabaratnam, V. 2012. Potential uses of spent mushroom substrate and its associated lignocellulosic enzymes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96(4):863-873. Doi: 10.1007/s00253-012-4446-9.
- Rhykerd, R. L.; Crews, B.; McInnes, K. and Weaver, R. 1999. Impact of bulking agents, forced aeration, and tillage on remediation of oil-contaminated soil. *Biores. Technol.* 67(3):279-285.
- Rivera-Espinoza, Y. and Dendooven, L. 2004. Dynamics of carbon, nitrogen and hydrocarbons in diesel-contaminated soil amended with biosolids and maize. *Chemosphere.* 54(3):379-386. Doi: 10.1016/S0045-6535(03)00653-2.
- Royse, D. J.; Baars, J. and Tan, Q. 2017. Current overview of mushroom production in the world. *In: Diego, C. Z. and Pardo-Giménez, A. (Ed.). Edible and medicinal mushrooms: Technology and Applications. John Wiley y Sons Ltd, Hoboken. 5-13 pp.*

- Sasek, V.; Bhatt, M.; Cajthaml, T.; Malachová, K. and Lednická, D. 2003. Compost-mediated removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 44(3):336-342. Doi: 10.1007/s00244-002-2037-y.
- Saviozzi, A.; Cardelli, R. and Cozzolino, M. 2009. Bioremediation with compost of a diesel contaminated soil: monitoring by dehydrogenase activity and basal respiration. *Compost Sci. Util.* 17(1):55-60. Doi: 10.1080/1065657X.2009.10702400.
- Schulte, P. A. and Hauser, J. E. 2012. The use of biomarkers in occupational health research, practice, and policy. *Toxicol. Letters.* 213(1):91-99. Doi: 10.1016/j.toxlet.2011.03.027.
- SIAP. 2021. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. <http://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119>.
- Sylvia, D. M.; Fuhrmann, J. J.; Hartel, P. G. and Zuberer, D. A. 1999. Principles and applications of soil microbiology. Upper Saddle River, New Jersey. ISBN-13:978-0130941176.
- Singh, A. D.; Vikineswary, S.; Abdullah, N. and Sekaran, M. 2011. Enzymes from spent mushroom substrate of *Pleurotus sajor-caju* for the decolourisation and detoxification of textile dyes. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27(3):535-545. Doi: 10.1007/s11274-010-0487-3.
- Stabnikova, O.; Wang, J. Y. and Ivanov, V. 2010. Value-added biotechnological products from organic wastes. *In: Wang, L.; Ivanov, V. and Tay, J. H. (Ed.) environmental biotechnology. Handbook of environmental engineering, vol 10.* Humana Press, Totowa, NJ. 343-394 pp. Doi: 10.1007/978-1-60327-140-0.8.
- Upadhyay, R. and Singh, M. 2011. Production of edible mushrooms. *In: hofrichter M. (Ed.) industrial applications. The mycota (a comprehensive treatise on fungi as experimental systems for basic and Applied Research), vol 10.* Springer, Berlin, Heidelberg. 79-97 pp. Doi: 10.1007/978-3-642-11458-8.4.
- Vos, A. M.; Heijboer, A.; Boschker, H. S.; Bonnet, B. and Lugones, L. 2017. Microbial biomass in compost during colonization of *Agaricus bisporus*. *AMB Express.* 7(12):1-7. Doi: 10.1186/s13568-016-0304-y.
- Wan, C. and Li, Y. 2012. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biotechnol. Adv.* 30(6):1447-1457. Doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.03.003.
- Wang, C.; Yu, D.; Shi, W.; Jiao, K.; Wu, B. and Xu, H. 2016. Application of spent mushroom (*Lentinula edodes*) substrate and acclimated sewage sludge on the bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon polluted soil. *RSC Advances.* 6(43):37274-37285. Doi: 10.1039/C6RA05457A.