



UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PREVIO A LA
OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:**

MAGÍSTER EN QUÍMICA APLICADA

TÍTULO DEL PROYECTO:

**“EFICIENCIA DE LOS HONGOS *Pleurotus ostreatus* Y *Aspergillus niger* EN LA
BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON METALES PESADOS”**

TUTOR:

VALENZUELA COBOS JUAN DIEGO

AUTOR:

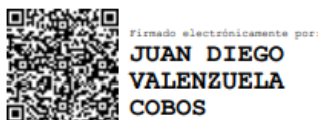
VILLOTA GARCÍA VERÓNICA PAOLA

MILAGRO, Junio de 2022

ACEPTACIÓN DEL TUTOR

Por la presente hago constar que he analizado el proyecto de grado presentado por VERÓNICA PAOLA VILLOTA GARCÍA, para optar al título de Magister en Química Aplicada y que acepto tutoriar a la estudiante, durante la etapa del desarrollo del trabajo hasta su presentación, evaluación y sustentación.

Milagro, a los 7 días del mes de febrero de 2022.



Juan Diego Valenzuela Cobos, PhD.

C.I. 0927981670

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DE LA INVESTIGACIÓN

El autor de esta investigación declara ante el Comité Académico del Programa de Maestría en Química Aplicada de la Universidad Estatal de Milagro, que el trabajo presentado es de mi propia autoría, no contiene material escrito de otra persona, salvo el que está referenciado debidamente en el texto; parte del presente documento o en su totalidad no ha sido aceptado para el otorgamiento de cualquier otro Título de una institución nacional o extranjera.

Milagro, a los 24 días del mes de junio del 2022.



Firmado electrónicamente por:
**VERONICA PAOLA
VILLOTA GARCIA**

Villota García Verónica Paola

C.I. 0604272617

CERTIFICACIÓN DE LA DEFENSA

EL TRIBUNAL CALIFICADOR previo a la obtención del título de Magister en Química

Aplicada otorga al presente proyecto de investigación las siguientes calificaciones:

MEMORIA CIENTÍFICA	[58,67]
DEFENSA ORAL	[39,67]
TOTAL	[98,33]
EQUIVALENTE	(EXCELENTE)



Firmado electrónicamente por:
**MONICA DEL
ROCIO VILLAMAR
AVEIGA**

MÓNICA VILLAMAR AVEIGA, M.Sc.

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



Firmado electrónicamente por:
**JUAN DIEGO
VALENZUELA
COBOS**

JUAN VALENZUELA COBOS, PhD.

DIRECTOR TFM



Firmado electrónicamente por:
**MANUEL ALEJANDRO
FIALLOS CARDENAS**

MANUEL FIALLOS CÁRDENAS, M.Sc.

SECRETARIO DEL TRIBUNAL

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Ingeniero

Fabricio Guevara Viejó, PhD.

RECTOR UNIVERSIDAD ESTATAL DE MILAGRO

Presente.

Mediante el presente documento, libre y voluntariamente procedo a hacer entrega de la Cesión de Derecho del Autor del Trabajo realizado como requisito previo para la obtención de mi Título de Cuarto Nivel, en la Maestría de Química Aplicada cuyo tema es **EFICIENCIA DE LOS HONGOS *Pleurotus ostreatus* Y *Aspergillus niger* EN LA BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON METALES PESADOS** y que corresponde a al Departamento de Investigación y Postgrado.

Milagro, 24 de junio del 2022



Firmado electrónicamente por:
**VERONICA PAOLA
VILLOTA GARCIA**

Villota García Verónica Paola

CI: 0604272617

DEDICATORIA

Dedico con todo cariño el esfuerzo que he puesto en el desarrollo del presente trabajo de investigación a mis tres amados hijos: Jonicito, Chris y a mi Angelito del cielo; a mi mejor amigo y compañero de vida, Jonathan, quienes son mis más grandes tesoros y mi motor más importante para luchar día con día por cumplir mis sueños, ser una profesional competitiva y sobre todo ser un mejor ser humano.

Verito

AGRADECIMIENTO

Agradezco con todo mi corazón a Dios por darme la vida y la oportunidad de alcanzar esta meta profesional, a mi madre y hermanos por su cariño y apoyo incondicional, a mi más grande tesoro: Jonicito, Chris y Jonathan, por darle sentido a mi vida y brindarme todo el amor que necesito para sentirme plena y feliz, al Dr. Diego Valenzuela por su acertada dirección en el desarrollo de esta investigación, a todos los docentes de la maestría en Química Aplicada de la Universidad Estatal de Milagro quien me transmitieron de manera desinteresada todos sus conocimientos, gracias totales.

Verónica Paola Villota García

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I	7
EL PROBLEMA	7
1.1.	7
1.2.	12
1.2.1.	12
1.2.2.	12
1.3.	13
CAPÍTULO II	14
2.1. MARCO TEÓRICO	14
2.1.1 Cantón Zaruma	14
2.1.2 Zona De Influencia	14
2.3 Metales pesados	19
2.3.1 Mercurio:	20
2.3.2 CADMIO	22
2.4 Normativa legal	24
2.4.1 Límites máximos permisibles de cadmio en el suelo	24
2.5 Método de Análisis de Metales Pesados	26
2.5.1 Espectrofotometría de Absorción Atómica	26
2.5.2 Instrumentación	26
2.5.3 Fuente de radiación	27
2.7 Mecanismos de Microorganismos para tratar Metales Pesados	30
2.7.1 Unión a metales, bioacumulación y biosorción	31
2.7.2 Transformación de la valencia del metal	32
2.7.3 Biometilación y mecanismo de volatilización	33

2.7.4 Mecanismo de precipitación química extracelular	34
2.7.5 Mecanismo simbiótico	35
2.8. <i>Aspergillus niger</i>	35
CAPÍTULO III	39
MATERIALES Y MÉTODOS	39
3.1. Variables.	39
CAPÍTULO IV	45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
4.1. Cuantificación de Mercurio en Suelos con tratamiento Con <i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>Aspergillus niger</i>	45
4.2 Cuantificación de Cadmio con tratamiento con <i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>Aspergillus niger</i>	46
4.3. Discusión	48
CAPÍTULO V	50
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	50
5.1. CONCLUSIONES	50
5.2. RECOMENDACIONES	51
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ANEXOS	57

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO N°1.

Contaminación por mercurio en ríos y sedimentos Ecuador	22
---	----

Cuadro N°2.

Criterios de calidad del suelo	24
--------------------------------	----

CUADRO N°3.

Criterios de remediación valores máximos permitidos	25
---	----

Cuadro N°4.

Concentración de Mercurio (mg/Kg) en Suelos tratados con <i>Pleurotus Ostreatus</i>	45
---	----

Cuadro N°5.

Concentración de Mercurio (mg/Kg) en Suelos tratados con <i>Aspergillus Niger</i>	45
---	----

Cuadro N°6.

Concentración de Mercurio (mg/Kg) en Suelos sin tratamiento (Control)	46
---	----

Cuadro N°7.

Concentración de Cadmio (mg/Kg) en suelos tratados con <i>Pleurotus ostreatus</i>	46
---	----

Cuadro N°8.

Concentración de Cadmio (mg/Kg) en suelos tratados con <i>Aspergillus niger</i>	47
---	----

Cuadro N°9.

Concentración de Cadmio (mg/Kg) en suelos sin tratamiento (control)	47
---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°1	
Área minera del cantón Zaruma	14
Figura N°2	
Fases de la actividad minera	16
Figura N°3.	
Escalas de explotación minera	17
Figura N°4.	
Quimbalete para extracción de oro	18
Figura N°5.	
Dinámica de los Metales pesados	19
Figura N°6.	
Estructura lámpara cátodo hueco	27
Figura N°7.	
Modelo de la lámpara de descarga sin electrodos	28
Figura N°8.	
Aspergillus niger	36

RESUMEN

El presente trabajo constituye un estudio investigativo-experimental enfocado a la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados. El objetivo de la investigación fue evaluar la eficiencia de los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus niger* en la biorremediación de suelos contaminados con Mercurio y Cadmio provenientes de una industria minera del cantón Zaruma provincia de El Oro, estableciendo el microorganismo que mejor actúa en la reducción de estos contaminantes ambientales. Se tomaron doce muestras, 6 tubos seleccionados para tratamiento adicionando 5UFC/mL de hongo *Pleurotus ostreatus* o *Aspergillus niger* respectivamente (dos fueron rotulados a tiempo inicial o tiempo 0, dos para evaluación a los 15 días y los dos restantes para cuantificación a los 30 días), y 6 tubos para realizar el control, posteriormente se cuantificó el Cadmio y Plomo en las muestras para ello se utilizó previo tratamiento la técnica de Espectrofotometría de Absorción Atómica usando el estándar de 1000 mg L⁻¹ para cada uno de los elementos. Al cuantificar la concentración de mercurio en el suelo tratado con *Pleurotus ostreatus* se logró una reducción de 51,45 a 31,25 mg/Kg; mientras que, el suelo tratado con *Aspergillus niger* redujo de 54,2 a 47,05 mg/Kg; al analizar el Cadmio se estableció que con el hongo *Pleurotus ostreatus* redujo de 38,05 mg/Kg a 25,05 mg/Kg; mientras que, con *Aspergillus niger* disminuyó este metal de 39,15 a 19,5 mg/Kg. Se determinó que, el microorganismo que mejor actúa en la reducción de Mercurio es *Pleurotus ostreatus* (reducción de 19,93 mg/Kg), en cuanto al Cadmio *Aspergillus niger* demostrándose mayor eficiencia (disminuyó este metal 19,65 mg/Kg), con estos resultados se demuestra la utilidad de los microorganismos en procesos de remediación ambiental.

Palabras claves: *Aspergillus niger*, Biorremediación, metales pesados, minería, *Pleurotus ostreatus*.

Abstract

The present work constitutes a research-experimental study focused on the bioremediation of soils contaminated with heavy metals. The objective of the research was to evaluate the efficiency of *Pleurotus ostreatus* and *Aspergillus niger* fungi in the bioremediation of soils contaminated with mercury and cadmium from a mining industry in Zaruma, province of El Oro, establishing the microorganism that best acts in the reduction of these environmental pollutants. Twelve samples were taken, 6 tubes selected for treatment by adding 5UFC/mL of *Pleurotus ostreatus* or *Aspergillus niger* fungus respectively (two were labeled at initial time or time 0, two for evaluation at 15 days and the remaining two for quantification at 30 days), and 6 tubes to perform the control, subsequently Cadmium and Lead were quantified in the samples for this purpose the Atomic Absorption Spectrophotometry technique was used prior treatment using the standard of 1000 mg L⁻¹ for each of the elements. When quantifying the concentration of mercury in the soil treated with *Pleurotus ostreatus*, a reduction from 51.45 to 31.25 mg/Kg was achieved; while the soil treated with *Aspergillus niger* reduced from 54.2 to 47.05 mg/Kg; when analyzing Cadmium, it was established that with the fungus *Pleurotus ostreatus* reduced from 38.05 mg/Kg to 25.05 mg/Kg; while, with *Aspergillus niger* decreased this metal from 39.15 to 19.5 mg/Kg. It was determined that, the microorganism that best acts in the reduction of Mercury is *Pleurotus ostreatus* (reduction of 19.93 mg/Kg), as for Cadmium *Aspergillus niger* demonstrating greater efficiency (decreased this metal 19.65 mg/Kg), with these results the usefulness of microorganisms in environmental remediation processes is demonstrated.

Key words: *Aspergillus niger*, Bioremediation, heavy metals, mining, *Pleurotus ostreatus*.

INTRODUCCIÓN

Al hablar del suelo es preponderante mencionar que éste es un recurso sustancial, del cual es dependiente las condiciones de vida de las personas, los animales, las plantas y todos los seres vivos que habitamos en el planeta, la calidad del suelo también es esencial para el desarrollo económico y social de las naciones. (Guerrero & Pineda, 2016)

La actividad minera sin enfoque de responsabilidad ambiental ocasiona cambios en la dinámica del suelo, esto como consecuencia de la acumulación de compuestos tóxicos, como ciertos metales pesados, lo cual influye en la reducción significativa de la biodiversidad de las especies vegetales y de fauna del suelo, esto tiene como consecuencia la erosión de los suelos y el acarreo de los metales pesados a otros hábitats como ríos, manglares y mares. (Laricano, 2018)

Para la extracción de metales preciosos tales como el oro y la plata, es necesario emplear compuestos químicos y de elevados volúmenes de agua en los pozos de extracción, en el interior de estos están sustancias propias del tipo de suelo que, al ser combinadas con los compuestos químicos, generan una enorme proporción de desperdicios o subproductos del proceso de minería, los mismo que son tóxicos. La contaminación del suelo ocurre una vez que este tipo de tóxicos se integran al medio ambiente sin haber sido tratados adecuadamente. (Oviedo et al., 2017)

El efecto nocivo de los metales pesados es elevado. Su acción toxicidad afecta a los seres vivos ya que estos pueden bloquear las reacciones bioquímicas del organismo, como, por ejemplo, inactiva las enzimas al unir el metal y los grupos sulfhidrilos de algunas proteínas, ocasionando enfermedades o efectos en muchas ocasiones irreversibles y/o mortales en quienes se exponen a ellos. (Valls, M. & De Lorenzo, V., 2002)

Para realizar la remediación de ambientes altamente contaminados como estos, se aplican métodos químicos que implican procesos de costos elevados gracias a la especificidad que los mismos requieren. Además, se ha evidenciado que, esta clase de solución no se puede aplicar en todos los casos, debido a que, es dificultoso trabajar sobre uno en específico ya que existe una competencia entre ellos, por la presencia de otros. Por otro lado, la utilización de métodos biológicos para remediar conocido como biorremediación, permite una mayor especificidad a la hora de realizar la remoción del metal de específico que se desee reducir en el ambiente, además de que permite tener una flexibilidad operacional, y ese ha visto que puede ser aplicable en sistemas ex situ y en in situ. (Vullo, 2003)

Ciertas bacterias y hongos pueden llevar a cabo varios procesos para reducir su toxicidad en el ambiente, por ejemplo la movilización del metal, pasándolo de estados insolubles a solubles, a través de un proceso conocido como lixiviación microbiana, o el efecto contrario por medio de la inmovilización del metal, pasando de un estado soluble inicial en fase acuosa a uno insoluble final en fase sólida, dependiendo de cuáles son las características físicas del metal y del suelo que se pretende recuperar.(Vullo, 2003)

Los metales pesados no son biodegradables, pero ciertas bacterias y hongos pueden concentrarlos y aislarlos para que no estén libres, es decir que no se encuentren biodisponibles y por tanto no puedan contaminar. (ArgenBio, 2007).

El hongo *Pleurotus ostreatus* posee una amplitud enzimática diversa por lo que ha demostrado ser útil en la descontaminación de compuestos químicos de la biosfera. (Jiménez, 2016)

Aspergillus niger es un hongo que tiene una alta tolerancia a concentraciones de metales pesados, por lo que puede ser usado como un biorremediador ambiental que reduce estos compuestos tóxicos cuando se encuentran libres en el ambiente. (Villavicencio, 2019)

Existen diversas investigaciones en los que se aplicados métodos biológicos de remediación de ambientes contaminados por metales pesados, entre ellos se puede mencionar:

El estudio titulado “El papel de los microorganismos en la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados” realizado en México por Covarrubias y colaboradores en el año 2015, en el estudio se hace referencia al impacto negativo que tienen una actividad minera irresponsable sobre el ambiente, los investigadores concluyeron que, la aplicación de la biotecnología aprovechando las características bioquímicas y metabólicas de los microorganismos como las bacterias y hongos, son una alternativa útil y aplicable para la recuperación de suelos contaminados por metales pesados.

Beltrán y Gómez (2016) realizaron el estudio: Biorremediación de Metales pesados Cadmio (Cd), Cromo (Cr) y Mercurio (Hg) mecanismos bioquímicos e Ingeniería Genética: Una revisión, en la investigación mencionan la alta toxicidad de los metales pesados para el ambiente debido a los grandes efectos nocivos que tiene sobre toda la biosfera y sus habitantes, los autores hacen énfasis en el Cadmio, cromo y mercurio por su persistencia y toxicidad. Además, mencionan que, actualmente se dispone de varias técnicas fisicoquímicas usadas para el tratamiento de estos contaminantes, las mismas que han demostrado tener ciertas deficiencias, limitaciones y efectos secundarios a largo plazo. Por último los investigadores concluyen que, los microorganismos como las bacterias y los hongos, presentan diversas capacidades metabólicas en los que utilizan varios sustratos para generar la energía que necesitan y en ocasiones estos contaminantes son

sustancias que logran ser paralizados o transformados por ciertos hongos y bacterias a través de la aplicación de estrategias que pueden afectar su biodisponibilidad, por lo que recomiendan la implementación de estas técnicas de Biotecnología ambiental.

Coello (2011) a través de su investigación realizada con *Pleurotus ostreatus* en biorremediación, llega a la conclusión que, este hongo cuenta con las características metabólicas que le permiten ser considerado como una opción útil para la aplicación de métodos biológicos en la remediación de suelos, considerando a este como un método viable por su capacidad de remoción de metales pesados, y haciendo énfasis en que esta constituye una opción sostenible por ser económica para recuperar suelos y mejorar el medio ambiente.

Villavicencio (2019), realizó el estudio con el hongo *Aspergillus niger* para tratar aguas contaminadas, en el que destaca el potencial uso de los métodos biológicos a través de los hongos y bacterias para la remoción de metales pesados, describe a estos como útiles y viables para atenuar el efecto de estos tóxicos y establece que este hongo es ideal para este tipo de procesos pues no es exigente en cuanto a nutrientes y condiciones ambientales, además menciona que este microorganismo precisa las cualidades de remoción de metales a través de bioadsorción, bioacumulación y biotransformación.

Con base en los antecedentes mencionados, se puede decir que, estos métodos biológicos en los que se aprovecha las propiedades bioquímicas y metabólicas de los diversos microorganismos presentes en la naturaleza son una opción más factible frente a los métodos tradicionales para la descontaminación de metales pesados. Aunque es necesario, seguir investigando los diferentes microorganismos de los ambientes contaminados por estos metales,

pues es así como se puede identificar cepas más resistentes que presenten mayor adaptación y con mejores características que les permitan ser utilizadas en la biorremediación de suelos.

A través de la presente investigación pretende evaluar y comparar a escala de laboratorio la eficiencia de los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus niger* para la biorremediación de suelos contaminados con Mercurio (Hg) y Cadmio (Cd) provenientes de una industria minera del Ecuador.

Para lo cual se caracterizó los parámetros químicos, físicos y microbiológicos de los suelos procedentes de una industria minera del cantón Zaruma provincia de El Oro, posteriormente se realizó la reproducción de los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus niger* a nivel de laboratorio y bajo las condiciones (pH y temperatura) similares a las del lugar de procedencia de las muestras, para luego inocularlos en los suelos contaminados, se evaluó la concentración de metales pesados Hg y Cd en un periodo de tiempo de 30 días, y con estos datos experimentales finalmente se definió el hongo más eficiente para la disminución de los metales pesados analizados.

La investigación está conformada por los siguientes componentes: páginas preliminares determinadas por la universidad, introducción y cinco capítulos.

Los capítulos en su contenido están determinados en una secuencia y relación lógica entre sí con respecto a su forma y fondo para mejor comprensión a través de una descripción real de los objetivos y el alcance de la investigación.

En el capítulo I se presenta el Problema en el que se hace referencia a su delimitación para consecuentemente establecer los objetivos que se buscan alcanzar, revelándose en este apéndice la relevancia del tema a través o de la sustentación de la justificación, señalando de manera precisa

cual será el aporte teórico del estudio, por último, en este capítulo se hace una descripción resumida de la metodología a utilizar.

En el capítulo II se encuentra el Marco Teórico en este se hace énfasis en toda la información relevante y de fuentes primarias que se consideren útiles para el encuadre del estudio, se topan tópicos tales como: Biorremediación, *Pleurotus ostreatus*, *Aspergillus niger*, Industria minera y impacto en el ambiente y salud del Cadmio y el Mercurio, métodos de análisis de metales pesados, legislación vigente, etc.

En el capítulo III del Materiales y Métodos se detalla de manera clara, objetiva y ordenada cómo se desarrolló la investigación, aplicando métodos y técnicas microbiológicas y químicas.

En el Capítulo IV se encuentra el análisis de los resultados alcanzados a través de la discusión, en donde se plasma el impacto e importancia del presente trabajo.

Finalmente, en el Capítulo V se establecen las conclusiones fruto del resultado del estudio y constituye el aporte teórico, la significación práctica y la novedad científica demostrada a través de la investigación.

CAPITULO I

EL PROBLEMA

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1.1. Problematicación

La minería a través del tiempo ha evidenciado críticas implicaciones medioambientales esto como consecuencia de las deficientes condiciones en que, viven las personas que realizan dicha actividad laboral. Esto, sumado a la pobre infraestructura sanitaria y al deficiente nivel tecnológico, ha generado un deterioro considerable del medio ambiente; además, se ha identificado en los lugares donde se encuentran ubicados estas industrias un elevado índice de personas, plantas y animales con deterioro de su salud, por causa de la toxicidad de estos procesos metalúrgicos. (Coello, 2011)

Los compuestos químicos, que se utilizan para la extracción de minerales, generandesechos que terminan en los efluentes, los mismos que una vez que entran en contacto con los seres vivos pasan al organismo por distintas vías y pueden acumularse en los tejidos, generando diversos problemas de salud, como el cáncer. (Calderón, 2020)

La mayoría de las industrias minera, especialmente las artesanales realizan sus procesos sin aplicar la tecnología adecuada, posesionándose en uno de los principales problemas de contaminación del ambiente.

Los metales pesados que se encuentran biodisponibles en la naturaleza por la contaminación de diversas industrias inciden negativamente en la calidad de vida, debido a su toxicidad que afecta indiscutiblemente a la salud de todos los seres vivos que se exponen a ellos y al medio ambiente. La elevada toxicidad de estos compuestos en los suelos está directamente asociada con la concentración disponible que es asimilada por los organismos, y guardan directa

relación con las características fisicoquímicas del suelo, entre las importante están: el pH, potencial redox y materia orgánica, etc. (Laricano, 2018)

Exponerse a concentraciones de estos metales hacen que estos se bioacumulen en la biosfera y a través de las cadenas tróficas llegan a los seres humanos.

Entre los daños que pueden causar a los organismos se puede mencionar: daño de varios órganos, diarrea, vómito y problemas respiratorios, úlceras gástricas, anemia y cáncer, etc. (Cárdenas, 2014)

En la historia se han reportado varias catástrofes ambientales relacionados a este sector industrial, frecuentemente ocasionados por las malas prácticas dentro de esta.

Por mencionar algunos de los desastres que ha ocasionado la industria minera se puede señalar: el daño severo a suelos y agua de ríos y océanos, destrucción de la flora y la fauna y los efectos nocivos en la salud de la población que se encuentra en la proximidad de las minas. (Maroneze et al., 2014)

En todo el mundo se ha evidenciado eventos críticos relacionados a contaminación con estos tóxicos, por causa de actividades mineras, se pueden detallar los siguientes:

En Estados Unidos en las localidades de Montana, California, Colorado, Oklahoma hay grandes volúmenes de aguas contaminadas con Pb, Hg y varios más tóxicos a causa de las industrias mineras en los ríos aledaños a estas, contaminando setenta mil h. de estos ecosistemas, esto afecta la flora y la fauna y al suministro de agua potable (Vernieri, 2020)

En México se ha documentado que, en el 2014, en la mina de Cananea causó el derrame de H₂SO₄ afectando a cerca de 22.000 habitantes. (Vernieri, 2020)

Perú es un país que también se vio críticamente afectado por un incidente en 2014, cuando un derrame de mercurio, generó una masiva intoxicación, los daños ambientales fueron grandes. (Vernieri, 2020)

En Ecuador, no somos ajenos a este problema, existen áreas donde esta Industria se ha convertido en el sustento de una gran cantidad de población, como es el Cantón Camilo Ponce Enríquez en la provincia del Cañar, Tena y Portovelo y Zaruma estos dos últimos cantones de la provincia de El Oro, sobre todo porque en estos lugares existen yacimientos artesanales, en donde se realiza la extracción de ciertos metales preciosos como el oro, sin contar con las medidas básicas de protección, convirtiéndose en un riesgo para el ambiente y la salud de quienes laboran y habitan en estos lugares. (Banco Central del Ecuador, 2015)

En un estudio realizado por biólogos de Ecuador y Brasil obtuvieron como resultado que, en las zonas aledañas a las minas, la concentración de unos metales pesados es quinientas veces más elevado de lo permisible por las normativas vigentes tanto nacionales como internacionales. (Vernieri, 2020)

La minería aurífera en nuestro país ha generado importantes impactos en el ambiente, especialmente en las áreas Portovelo-Zaruma y Ponce Enríquez. La contaminación en estas zonas es principalmente por cianuro y metales pesados, especialmente el mercurio. Se estima que esto se debe principalmente a los contaminantes que son descargados directa o indirectamente en los ríos, ya que en su mayoría son minas artesanales que realizan una disposición inadecuados. Esto a causado la muerte de varias especies en estos ríos. (Coello, 2011)

Las técnicas para la remediación de suelos se basan en métodos fisicoquímicos los mismos que tienen como limitante que incluyen procedimientos elevados costos y por su complejidad algunos de ellos no resultan útiles o viables, especialmente in situ, puesto que, no es posible actuar sobre un metal determinado, ya que existe una competencia entre todos los metales presentes, por tanto no es aplicable muchos de los métodos existentes, y esto constituye una desventaja con respecto a los métodos biológicos los mismos que demuestran una mayor especificidad en la reducción del metal de interés y además ofrece la ventaja de que este método presenta una mayor flexibilidad en las operaciones, tanto en sistemas in situ como ex situ. (Vullo, 2013)

De acuerdo a varios estudios realizados existen diversos microorganismos que presentan capacidad biorremediadora, por lo que es esencial seleccionar el o los organismos más adecuados para que el tratamiento sea lo más óptimo posible, esto precisamente es lo que se pretende realizar con la presente investigación, a través de la cual, se busca comparar la eficiencia de la capacidad biorremediadora de los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus niger* en suelos contaminados con metales pesados procedentes de la industria minera y con ello definir el microorganismo que mejor actúa en la disminución de estos contaminantes ambientales. (Rodríguez & Meléndez, 2019)

1.1.1. Delimitación del problema

Espacio: En la República del Ecuador, Región Costa, Provincia del Oro, en el Cantón Zaruma, Una industria minera particular.

Tiempo: La Investigación se realizó en los meses de diciembre 2021, enero y febrero de 2022.

Universo: Zona de influencia (aproximadamente 2 km a la redonda de la bocamina) de una Industria minera del cantón Zaruma.

1.1.2. Formulación del problema

¿Cuál es la eficiencia de los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus niger* en la biorremediación de suelos contaminados con Mercurio (Hg) y Cadmio (Cd) provenientes de una industria minera?

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo General

Evaluar la eficiencia de los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus niger* en la biorremediación de suelos contaminados con Mercurio y Cadmio provenientes de una industria minera del cantón Zaruma, a través de métodos microbiológicos y espectroscopia de absorción atómica, estableciendo el microorganismo que mejor actúa en la reducción de estos contaminantes ambientales.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Cuantificar los metales pesados (Hg y Cd) en los suelos procedentes de una industria minera del cantón Zaruma provincia de El Oro, antes durante y después del tratamiento con los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus niger*
- Realizar las pruebas microbiológicas que permitan el óptimo desarrollo, reproducción e inoculación de los hongos en los suelos estudiados.
- Identificar el hongo con mayor eficiencia en la reducción de Cadmio y Mercurio.

1.3. JUSTIFICACIÓN

La industria metalúrgica, esencialmente el sector minero ha demostrado provocar un impacto negativo en el medio ambiente ocasionando la contaminación de los suelos con sustancias tóxicas, de las que destaca especialmente los metales pesados y de ellos principalmente el mercurio. Los métodos más frecuentemente utilizados en la remediación de estos suelos son los físicoquímicos, los mismos que tienen como desventaja el elevado costo y algunos efectos secundarios negativos. La biorremediación es un método alternativo en el que se aprovecha la capacidad de ciertos hongos y bacterias para reducir o degradar los compuestos tóxicos que provocan la contaminación. (Jiménez, 2016)

La aplicación de la Biorremediación destaca porque su costo es inferior con respecto a otros métodos y porque actúa a través de la descomposición de la materia orgánica y el mejoramiento del ciclo de nutrientes. (Laricano, 2018)

La biorremediación permite mayor especificidad a la hora de tratar un metal determinado, además, presenta varias ventajas, entre las que se puede mencionar es que requieren baja inversión de capital, menor consumo de energía. (Jiménez, 2016)

Pleurotus ostreatus y *Aspergillus niger*, son 2 especies de microorganismos del reino fungi que en los últimos años han sido objeto de estudio por considerarse potencialmente útiles para procesos de biorremediación de suelo, se han obtenido resultados positivos con estas dos especies de hongos en la reducción de ciertos contaminantes ambientales, entre ellos destaca principalmente algunos metales pesados, además destaca de estos organismos que no son exigentes nutricionalmente y que para su desarrollo no se requiere de grandes inversiones de dinero ni esfuerzo, ya que se adaptan fácilmente, por lo que, su desarrollo en la zona donde se ejecutó la presente investigación no sería complicado, por tanto, existe viabilidad.

Es así que, con la presente investigación se ha buscado evaluar y comparar la capacidad de biorremediación de dos especies de hongos y determina así, el microorganismo que presente mayor eficiencia en la reducción de la cantidad de Cadmio y mercurio presentes en suelos contaminados provenientes de una industria minera de Ecuador. (Chanagá et al., 2012)

Lo interesante de utilizar estos hongos en la biorremediación es que si se llegara a comprobar que son efectivos para este fin, esto podría constituir una buena alternativa para la recuperación de suelos contaminados, es importante mencionar que, sus condiciones y propiedades de supervivencia no son exigentes lo que facilitaría su reproducción a gran escala, por lo que puede ser una técnica permanente y eficaz en el transcurso del tiempo, pudiendo establecerse como un método viable en nuestro país.

El presente estudio tiene relevancia por su innovación, pues no se han reportado anteriormente estudios comparativos de estas dos especies en este lugar; cuyo aporte científico es demostrar que la biotecnología es un mecanismo potencialmente útil, para renovar y recuperar el ambiente de una forma más amigable con nuestro planeta.

CAPÍTULO II

2.1. MARCO TEÓRICO

2.1.1 Cantón Zaruma

Zaruma es un cantón de la provincia de El Oro, ubicado en la parte alta suroriental de la misma. Este cantón tiene un clima subtropical, seco de mayo a noviembre y húmedo en la época lluviosa, turísticamente constituye una atracción para nacionales y extranjero. La temperatura oscila entre los 22°C y 25°C (Marambio, 2019)

La economía del cantón depende de la minería, primordialmente a la del oro. Además de la actividad minera, la producción agrícola es de vital importancia para el desarrollo económico de este lugar. (Marambio, 2019)

2.1.2 Zona De Influencia

Son los suelos aledaños a la zona minera del cantón Zaruma; alrededor de esta zona se evidencia terrenos y viviendas del cantón, las condiciones ambientales en este lugar continúan siendo afectadas de manera drástica.



Figura N°1 Área minera del cantón Zaruma (El diario, 2022)

A pesar de que los procedimientos han mejorado, gracias a la incrementación de la tecnología, a la par también lo hizo la intensidad de la producción, esto debido al aumento del precio del oro en la última década. Conjuntamente, las afectaciones ambientales han incrementado por factores tales como: la capacidad de producción de las plantas, ineficiente tratamiento de desechos, y el no poseer espacio físico donde colocar ciertos desechos sólidos conocidos como relaves, entre otros.

Los efectos ambientales negativos de esta zona son ampliamente conocidos ya que desde años atrás se han reportado investigaciones, todas coinciden en que esta zona es altamente contaminada, especialmente por metales pesados en concentraciones muy por encima de los límites máximos permisibles en las zonas industriales según las normas ambientales vigentes a nivel nacional e internacional. (Sánchez, 2015)

Hoy en día, la biotecnología nos ofrece un cúmulo de técnicas tecnológicas viables para favorecer al desarrollo sustentable, para mitigar los daños en ecosistemas contaminados, esta se aplica en campos, tales como: la elaboración de productos alimenticios; ciencias agrícolas, salud, productos industria química y protección ambiental a esta se la conoce como biotecnología ambiental y nos permite aplicar tecnología y biología para fines de recuperación de ambientes contaminados. (Guerrini, 2008)

2.2 La minería a nivel mundial y nacional

Se conoce como minería a la actividad humana que se realiza con fines económicos y que incluye extraer, explotar y aprovechar dichos minerales. (Banco Central del Ecuador, 2015)

2.2.1 Los minerales

Compuestos naturales, poseen características y propiedades físicoquímicas uniformes, se ha formado por la evolución geológica, poseen estructura química definida.

2.2.2 Tipos de Minerales

Metálicos: Dentro de estos se encuentran aquellos que se considera los metales preciosos como el oro y la plata, otros siderúrgicos como hierro, ciertos otros básicos: cobre y además están los metales ligeros como aluminio y magnesio. (Alberto, 2008)

No metálicos: Por ejemplo, ciertos materiales utilizados en industria de la construcción, como la arena, la grava, las arcillas, la caliza. (Guerrero & Pineda, 2016)

Los Combustibles, entre ellos el carbón, el lignito, el petróleo y el gas. (Banco Central del Ecuador, 2015)

2.2.3 Mina

Es un yacimiento, minerales o de materiales fósiles, que resultan útiles, aprovechables y rentables. (Banco Central del Ecuador, 2015)



Figura N°2 Fases de la actividad minera (Viana, 2018)

2.2.4 Escalas de explotación minera

La actividad minera puede ser discriminada técnicamente en una escala jerárquica que contempla las siguientes categorías: manual, pequeña, mediana y de gran escala.

Estas escalas de explotación minera se definen en función de varios criterios: (i) El tamaño de la operación medido en cantidad de mineral explotado o superficie, y (iii) Las características de ejecución o tecnología de las explotaciones. (Güiza, 2019)

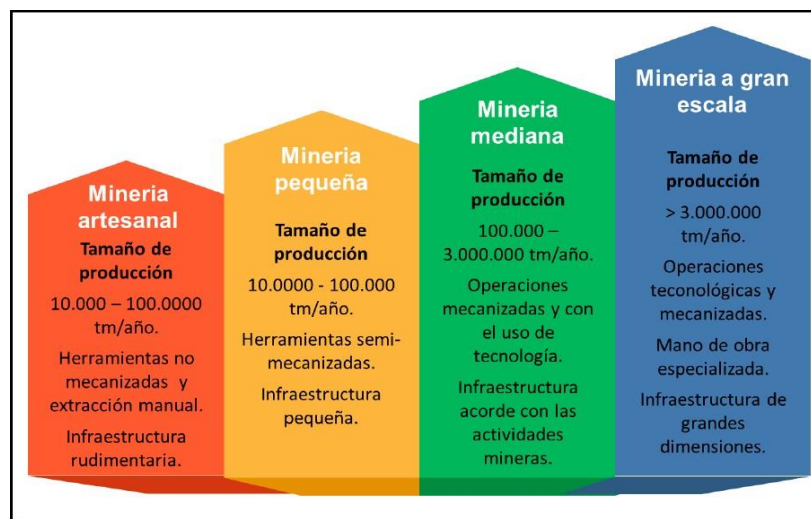


Figura N°3. Escalas de explotación minera (Calderón, 2020)

2.2.5 La minería artesanal

Desde una perspectiva pragmática la minería artesanal se corresponde con aquellas actividades extractivas mineras que se desarrollan con el uso de herramientas rudimentarias y técnicas manuales e instintivas, es decir, sin la utilización de las fases y técnicas convencionales de la actividad minera moderna.

La minería artesanal presenta el mismo tamaño o rango de producción que la minería pequeña, pero la diferencia clave es el aspecto rudimentario de la minería artesanal que conlleva a

una extracción ineficiente de los minerales y se suma a condiciones de trabajo inseguras, insalubres y de explotación de la mano de obra. (Calderón, 2020)

2.2.6 Impacto ambiental de la Minería artesanal del Oro

En el caso de la minería aurífera o del oro, que involucra a más de 15 millones de, se puede reseñar que la extracción artesanal se hace en forma manual. Una vez extraído el material que contiene el oro, los mineros artesanales utilizan dos métodos rudimentarios para procesar y extraer el oro. La amalgama con Hg fue la más utilizada hace algunos años, pero hoy en día, en muchas minas, se han sustituido por la cianuración (Alfonso et al. (2019).

Cuando el oro se procesa mediante el proceso de amalgamación, primero, se debe reducir el tamaño de las partículas, se obtiene utilizando un tipo molino de bolas o, a menudo se utilizan molinos artesanales denominados quimbaletes, este un tipo de mortero grande formado por un sumidero donde se ubica el mineral de oro con mercurio junto con una roca que hace la función de mazo. Encima se pone una mesa sobre la cual sube una persona quien será encargado de movilizar el mazo de piedra para por acción mecánica se triture el material. El oro termina separándose del mercurio fundiendo la amalgama al aire libre o en los espacios preparados para ello mediante retortas, En el proceso de combustión, el Hg se evapora y finalmente se obtiene el oro. (Ccolqqe, 2019)



Figura N°4. Quimbalete para extracción de oro (Ccolqqe, 2019)

2.3 Metales pesados

Los metales pesados son aquellos elementos que poseen una densidad mayor que los otros metales (igual o mayor a 5 g/cm^3). En la biosfera se encuentran en un porcentaje inferior al cero punto uno por ciento. Se conocen 2 tipos de metales; los que se les conoce como oligoelementos, entre ellos podemos mencionar Cobalto, Cobre, hierro, Molibdeno, Magnesio, Zinc, etc., actúan en mecanismos bioquímicos del organismo, en el organismo están en pequeñas cantidades (trazas); otro grupo conocido como metales pesados estos no poseen actividad biológica como otros metales., por el contrario, son nocivos es así que, en cantidades mayores, resultan tóxicos y suelen acumularse en los organismos. (Morocho & Puente, 2019)

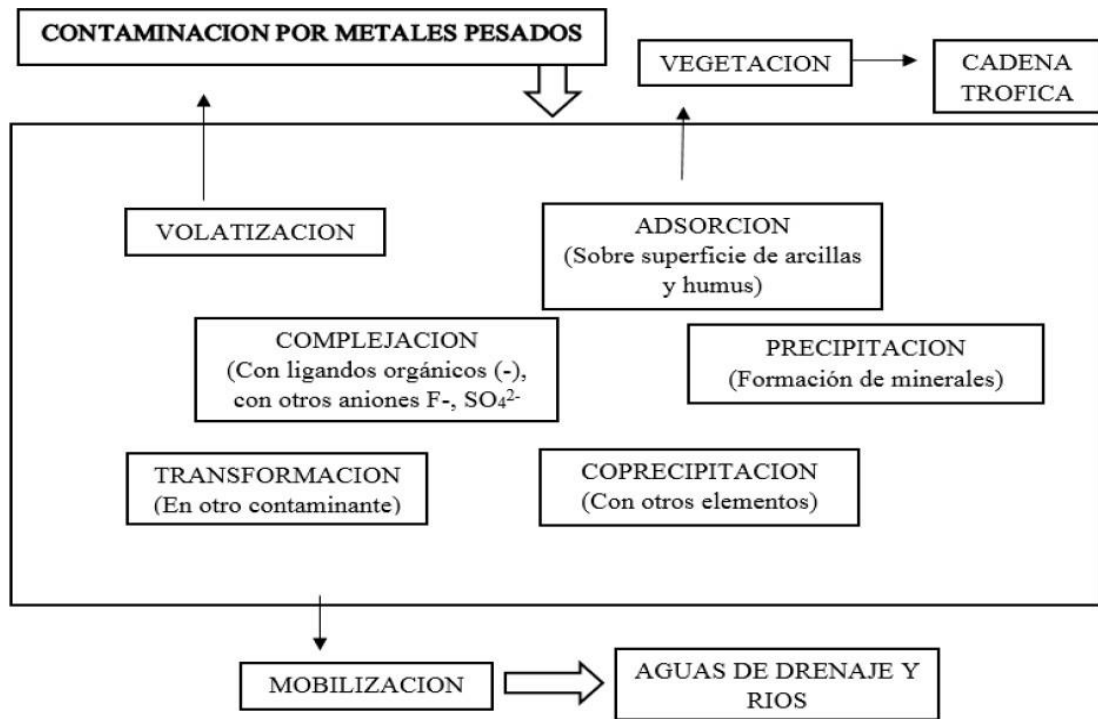


Figura N°5. Dinámica de los Metales pesados (Morocho & Puente, 2019)

2.3.1 Mercurio:

Metal plateado y brillante, su particularidad es que es el único que se encuentra a temperatura ambiente en estado líquido. número atómico es 80, Su densidad es alta (13.53 g/cm³), elemento pesado más estables del planeta y su solubilidad en agua es baja (6x10⁻⁵ g/l a 25 °C), no conduce el calor, pero sí la electricidad. Es altamente volátil, tiene una tensión superficial de 0.51 N/m, y su viscosidad es relativamente baja (0,016 Poises a 20 °C) esto hace que no moje las superficies. (Alberto, 2008)

La razón por la que es muy utilizado en la industria minera es porque este se alea con facilidad con otros metales como el oro y la plata dando origen a lo que se conoce como amalgamas. (Beltrán & Gómez, 2016)

Del total de mercurio presente en el planeta, el mayor porcentaje deriva de fuentes antropogénicas, pues cada año se liberan en el ambiente aproximadamente 5000 toneladas de este.

Pero es claro que, por el alto valor económico del oro, es precisamente la actividad minera la que genera mayormente las emisiones mundiales de mercurio cerca del 35% del total. (Castelo, 2015)

2.3.1.1 Toxicidad del Mercurio

El mercurio es un elemento altamente tóxico. Su absorción puede ser por: respiratoria, oral y cutánea. Cuando hay una exposición prolongada causa efectos tales como: infarto al miocardio, fibromialgias, lupus, demencia, enfermedades neurológicas, degenerativas, cáncer, etc. Al poder unirse al azufre de los grupos sulfhidrilos, puede afectar a la función enzimática a través de la inactivación de las enzimas, puede bloquear el metabolismo, funciones celulares. (Castelo, 2015)

2.3.1.2 Niveles de exposición y niveles máximos permisibles

Los organismos reguladores ambientales y de salud han determinado el límite máximo de contenido de Hg, con el propósito de cuidar la salud de las personas y proteger al ecosistema. La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos, ha establecido como nivel máximo un valor de 0,002 mg/L en agua potable, La Organización mundial de la Salud considera e un valor de 0,001 ppm en aguas y 0,001 ppm en aire. (Santos et al., 2017)

En nuestro país la Norma de Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes, Recurso Agua del año 2010, ha establecido el valor de 0,001 ppm en aguas domésticas y agrícolas; y 0,18 µg/L en subterráneas. La Norma INEN 1 108: 2011, IV revisión establece COMO permisible hasta de 0,006 ppm para en agua potabilizada. (Guerrero & Pineda, 2016)

2.3.1.3 Contaminación por mercurio

Nuestro continente, es una de las regiones donde aún se lleva a cabo la minería de forma artesanal en la extracción oro, esto debido a la baja o nula inversión en tecnologías, muchas veces, este tipo de actividades no se realizan de manera legal, siendo nuestro país, el cuarto de Latinoamérica que produce como desecho y desprende al ambiente mayor cantidad de mercurio en el mundo. (Alberto, 2008)

Estas son cifras desconcertantes, cada año se emiten 50 toneladas de mercurio provenientes de actividad minera realizada de forma artesanal en Zaruma, Nambija, Ponce Enríquez, , Portovelo en ciertas zonas de la provincia de Esmeraldas. En dichas áreas, los sedimentos y los compuestos de naturaleza química que se usan en la extracción son llevados varios Km. por medio de ríos aledaños, Lamentablemente estos tóxicos peligrosos llegan a depositarse en manglares y llegan al océano Pacífico, generando dentro de esos ecosistemas contaminación. (Coello, 2011)

Por mencionar una investigación realizada una zona de minería del Ecuador en Ecuador se evidenció que hay una gran contaminación a causa de usar del Hg, tal como se muestra en la Cuadro N°. (Castelo, 2015)

CUADRO N°1. Contaminación por mercurio en ríos y sedimentos Ecuador

Lugar de estudio	Agua de río Rango en µg Hg/L	Sedimentos Rango en µg Hg/kg
Nambija	0,1 - 29,8	0,5 - 256,9
Ponce Enríquez	1,9 - 47,8	3,2 - 440,8
Portovelo-Zaruma	0,003 - 1812,5	1,2 - 398,2

FUENTE: (Castelo, 2015)

2.3.2 Cadmio

Elemento del Grupo II-B de la Cuadro Periódica, su número atómico es 48 y presenta la siguiente configuración electrónica: 4d¹⁰ 5s². Normalmente se lo encuentra unido al Zn, Cu y Pb. Su uso principal en la industria es en la fabricación de pilas de baterías y barnices, se usa para recubrir ciertas superficies de metal y así evitar que se oxiden, en procesos como catalizador. (Marcano, 2013)

2.3.2. 1 Fuentes de contaminación por cadmio

Este elemento no es posible reciclarlo, este tiende a acumularse gradualmente en el ambiente, Este se lo encuentra muy raramente en la litosfera, este es utilizado en ciertas industrias, donde constituye un desecho que es fuente de contaminación:

- Industrias mineras

- Metalurgia de Fe y acero
- Elaboración de compuestos para fertilización
- Pigmentos y batería de níquel (Beltrán & Gómez, 2016)

2.3.2.2 Contaminación del suelo con Cadmio

El Cadmio constituye uno de los más importantes contaminantes esto debido a que es bioacumulable, además se considera muy tóxicos, tiene la característica de persistir en el medio ambiente, y de viajar en ríos y con el viento a lugares muy distantes.

El Cd cuando se obtiene como subproducto de tratamientos metalúrgicos, se produce el óxido de cadmio, el cual presenta una mayor toxicidad. (Ramírez, 2013).

Normalmente la concentración de Cd en suelos es menor a 1 mg kg^{-1} , estableciéndose en un valor de 0,001 a 0,5 ppm, cuando se encuentra en esas concentraciones no resulta tóxico o peligros, sin embargo, cuando hay un incremento del metal en el suelo este se vuelve altamente tóxico. (Morocho & Puente, 2019)

Se ha reportado que el cadmio en zonas de industrias está en valores que van desde de 9.1 a $26.7 \text{ } \mu\text{g}/\text{m}^3$ frente a 0.1 a $6 \text{ } \mu\text{g}/\text{m}^3$ en la zona rural. Este tiene un prolongado tiempo de permanencia que es de hasta 3 siglos del cual el noventa por ciento permanece sin transformarse. (Marcano, 2013)

2.3.2.3 Toxicidad del Cadmio

En ambientes laborales dentro de industrias donde se utiliza el cadmio, la ruta principal de ingreso es la inhalación y la absorción. La cantidad de Cd en líquidos corporales con la sangre incrementa durante los 6 meses iniciales a la exposición constante, ya en adelante su

concentración es proporcional a la del ambiente laboral. En exposiciones ocupacionales, el Cd se acumula en varios órganos vitales como corazón, hígado, pulmones.

2.4 Normativa legal

2.4.1 Límites máximos permisibles de cadmio en el suelo

De acuerdo con el Libro VI Anexo 2 del Texto unificado de legislación secundaria del medio ambiente: Norma calidad ambiental de recursos de suelos y Criterios de Remediación para suelos contaminados se establece el valor de calidad y remediación o restauración del suelo, que se considera admisible hasta los siguientes valores que se ilustran en la Cuadro siguiente:

Cuadro N°2. Criterios de calidad del suelo

Parámetro	Unidades*	Valor
Parámetros Generales		
Conductividad	uS/cm	200
pH		6 a 8
Relación de adsorción de Sodio (Índice SAR)		4*
Parámetros Inorgánicos		
Arsénico	mg/kg	12
Azufre (elemental)	mg/kg	250
Bario	mg/kg	200
Boro (soluble en agua caliente)	mg/kg	1
Cadmio	mg/kg	0.5
Cobalto	mg/kg	10
Cobre	mg/kg	25
Cromo Total	mg/kg	54
Cromo VI	mg/kg	0.4
Cianuro	mg/kg	0.9
Estaño	mg/kg	5
Fluoruros	mg/kg	200
Mercurio	mg/kg	0.1
Molibdeno	mg/kg	5
Níquel	mg/kg	19
Plomo	mg/kg	19
Selenio	mg/kg	1
Vanadio	mg/kg	76
Zinc	mg/kg	60
Parámetros orgánicos		
Benceno	mg/kg	0.03
Clorobenceno	mg/kg	0.1
Etilbenceno	mg/kg	0.1
Estireno	mg/kg	0.1
Tolueno	mg/kg	0.1
Xileno	mg/kg	0.1
PCBs	mg/kg	0.1
Clorinados Alifáticos (cada tipo)	mg/kg	0.1
Clorobenzenos (cada tipo)	mg/kg	0.05
Hexaclorobenceno	mg/kg	0.05
Hexaclorociclohexano	mg/kg	0.01
Fenólicos no clorinados (cada tipo)	mg/kg	0.1
Clorofenoles (cada tipo)	mg/kg	0.05
Hidrocarburos totales (TPH)	mg/kg	<150
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) cada tipo	mg/kg	0.1

*Concentración en peso seco de suelo

Fuente: (TULSMA. Anexo 2, 2015)

CUADRO N°3. Criterios de remediación valores máximos permitidos

Parámetro	Unidades (Concentración en peso seco de suelo)	USO DEL SUELO			
		Residencial	Comercial	Industrial	Otros usos
Parámetros Generales					
Conductividad	dS/mm	2	4	4	2
pH		6 a 8	6 a 8	6 a 8	6 a 8
Parámetros inorgánicos					
Arsénico (inorgánico)	mg/kg	15	15	15	12
Azufre (elemental)	mg/kg	-	-	-	500
Bario	mg/kg	500	2000	2000	750
Boro (soluble en agua caliente)	mg/kg	-	-	-	2
Cadmio	mg/kg	5	10	10	2
Cobalto	mg/kg	50	300	300	40
Cobre	mg/kg	63	63	63	63
Cromo Total	mg/kg	65	90	90	65
Cromo VI	mg/kg	0.4	1.4	1.4	0.4
Cianuro (libre)	mg/kg	0.9	8.0	8.0	0.9
Estaño	mg/kg	50	300	300	5
Flúor (total)	mg/kg	400	2000	2000	200
Mercurio	mg/kg	2	10	10	0.8
Molibdeno	mg/kg	10	40	40	5
Níquel	mg/kg	100	100	100	50
Plomo	mg/kg	100	150	150	100
Selenio	mg/kg	3	10	10	2
Talio	mg/kg	1	1	1	1
Vanadio	mg/kg	130	130	130	130
Zinc	mg/kg	200	380	380	200
Parámetros Orgánicos					
Aceites y grasas	mg/kg	<2500	<2500	<2500	500
Benceno	mg/kg	0.5	5	5	0.05
Etilbenceno	mg/kg	1.2	20	20	0.1
Estireno	mg/kg	5	50	50	0.1
Tolueno	mg/kg	0.8	0.8	0.8	0.1
Xileno	mg/kg	1	17	20	0.1
PCBs	mg/kg	0.1	0.1	0.1	0.1
Clorofenoles (cada tipo)	mg/kg	0.5	5	5	0.05
Fenoles (total)	mg/kg	3.8	3.8	3.8	3.8
Benzo(a)atraceno	mg/kg	1	1	1	0.1
Benzo(a)pirenos	mg/kg	0.7	0.7	0.7	0.1
Naftaleno	mg/kg	0.6	22	22	0.1
Pirenos	mg/kg	10	10	10	0.1
Bifenilos policlorados	mg/kg	1.3	33	33	0.5

Fuente: (TULSMA. Anexo 2, 2015)

La EPA (Agencia de protección ambiental, por sus siglas en inglés), determina que los valores normales de Cd en suelos no contaminados están en el rango de 0,01 a 0,7 ppm. (Morocho & Puente, 2019)

2.5 Método de Análisis de Metales Pesados

2.5.1 Espectrofotometría de Absorción Atómica

La espectrofotometría de absorción atómica es un método sensible y específico para la cuantificar alrededor de sesenta metales o metaloides. Esta técnica se fundamenta en determinar la radiación absorbida por átomos en estado libre, es necesario que la longitud de onda del haz de luz incidente concuerde con la frecuencia de resonancia del elemento que se pretende analizar, además de que los átomos del analito se encuentren en estado libre. Se considera a la espectrofotometría de absorción atómica como una técnica con un área de aplicación extensa, entre las que se puede mencionar: en la identificación de contaminantes (como, Cu, Hg, Pb, As, Cd), en productos alimenticios, aguas, geología, industria farmacéutica, residuos en suelos, metalurgia (aleaciones), medicina (análisis de ciertos metales tóxicos en el organismo), arqueología, industria petrolera, pinturas. (Castelo, 2015)

2.5.2 Instrumentación

El equipo utilizado en esta técnica se llama Espectrofotómetro de absorción atómica, este está estructurado por 4 componentes: 1. fuente de radiación, 2. atomizador, 3. selector de longitud de onda o monocromador, 4. detector y un procesador de la señal para la lectura.

2.5.3 Fuente de radiación

Lámpara de cátodo hueco: Está compuesta por un ánodo de W y un cátodo cilíndrico construido a base del metal de cual se desea conocer el espectro estos se encuentran cerrados herméticos dentro de 1 tubo de vidrio que tiene Ne o Ar con una presión de uno a cinco torr. Una vez que se aplica el potencial de 300 Voltios esto ocasiona la ionización del gas de llenado, esto causa que los iones choquen con el cátodo y generan iones gaseosos del metal, produciendo una nube donde se encuentran átomos del metal en forma excitada, los mismo que, cuando regresan a su estado normal generan radiación de una cierta longitud de onda. (Calderón, 2020)

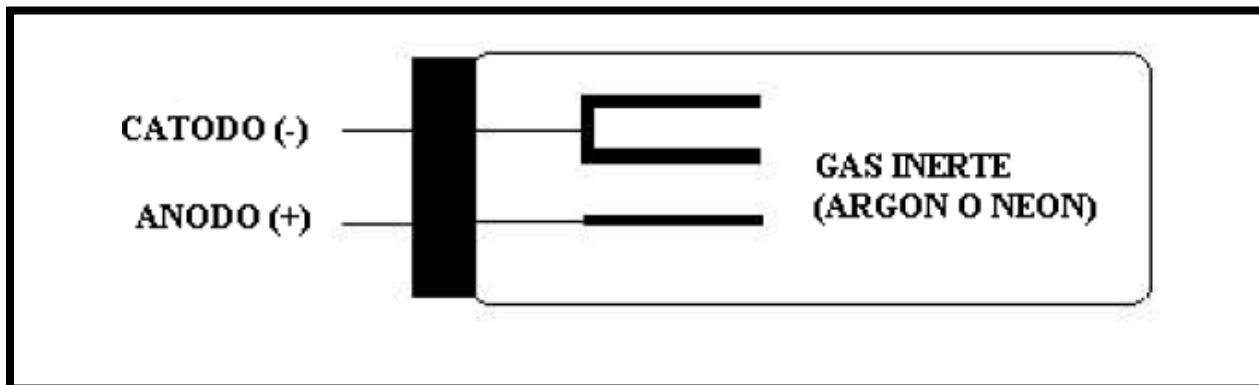


Figura N°6. Estructura lámpara cátodo hueco (Castelo, 2015)

Lámpara de descarga sin electrodos: Este componente del equipo genera intensidades radiantes que son 2 órdenes de valores superiores a las lámparas de cátodo hueco. Esta se encuentra formada por 1 tubo de cuarzo que se encuentra cerrado de manera hermética, aquí se encuentra el metal en forma pura y un gas inerte que generalmente es el Ar. Esta estructura no tiene electrodos, por tanto, cuando se desea que se active se utiliza una radiación de microondas. Entonces, el Ar se ioniza, produciéndose la aceleración de estos iones a través de las radiofrecuencias, obteniéndose la cantidad necesaria de energía para lograr la excitación de los átomos del metal. (Castelo, 2015)

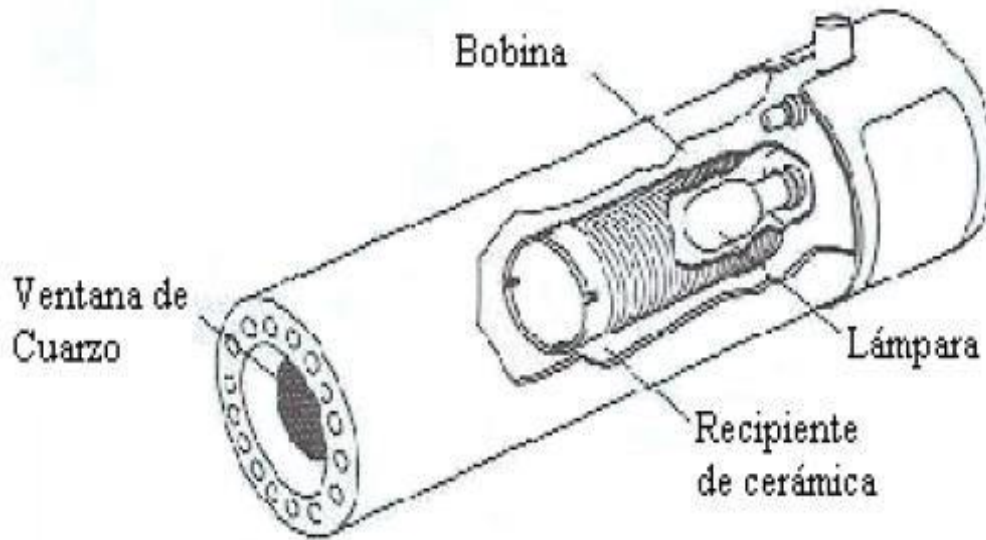


Figura N°7. Modelo de la lámpara de descarga sin electrodos (Castelo, 2015)

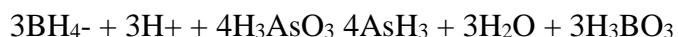
Atomización de la Muestra

Atomización por llama: En esta estructura, el aerosol de la muestra y el combustible son mezclados para a continuación pasarlos por varios deflectores que se encargan de impedir que pasen las gotas de dilución que no sean lo suficientemente pequeñas. En un mechero se procede a quemar, que tiene una ranura que genera llamas de cinco a diez centímetros de longitud. Estos mecheros de flujo laminar originan una llama estable lo que permite incrementar la sensibilidad y reproducibilidad del resultado, haciendo que esta técnica sea muy confiable. (Castelo, 2015)

Generación de Hidruros: se emplea cuando se desea determinar algunos elementos como: arsénico, antimonio, selenio, bismuto o mercurio, ya que permite ser llevados a sus formas elementales. Presenta como ventaja que permite un mejor límite para detectar estos elementos, esto debido a que la solución que posee los iones que se buscan analizar, es atomizada de forma directa en la llama. Los hidruros volátiles se forman de manera rápida produciendo la adición de una solución de borohidruro de sodio a la muestra acidificada. A continuación, la Rx formada:



El H₂ obtenido aquí formará el hidruro volátil, al unirse al elemento que se pretende cuantificar. aquí se produce la arsina (AsH₃) como se muestra a continuación:



Este hidruro volátil se arrastra a la cámara de atomización por un gas inerte, como puede ser el argón hacia un tubo de cuarzo, el mismo se calienta con la finalidad de transformar el hidruro en átomos de analito.

El mercurio, es un caso excepcional, ya que este, al unirse en combinación la muestra en solución con el borohidruro de Na, se produce de manera directa Hg en estado elemental, por tanto, no se necesita usar la llama. En este caso la cuantificación se establece por absorción o emisión de energía. (Castelo, 2015)

2.6. Biorremediación

Se considera a los metales de alto peso molecular dentro de los agentes de contaminación con mayor efecto tóxico para el ambiente, ya que se ha comprobado que tienen efectos nocivos para toda la cadena trófica en general, el cadmio, cromo y mercurio se consideran como entre los más peligrosos ya que entre sus características destaca su persistencia y alta toxicidad. Hoy en día se cuenta con varias técnicas fisicoquímicas, usadas para el tratamiento de dichos contaminantes, estas técnicas han mostrado ser poco eficientes y provocar efectos secundarios a corto y largo plazo. Es por esto por lo que se ha investigado y buscado otro tipo de tecnologías, como por ejemplo las que impliquen seres vivos con capacidades bioquímica y metabólicas específicas y especiales, este tipo de técnicas han generado resultados prometedores en algunas investigaciones donde se han aplicado para procesos de biotransformación.

Algunas bacterias, hongos y plantas poseen en su organismos ciertos mecanismos bioquímicos que les permiten neutralizar el efecto toxico de estos elementos, este grupo de métodos biológicos son los que hoy en día en la biotecnología ambiental se les conoce como biorremediación. (Beltrán & Gómez, 2016)

La biorremediación es un método, en el que se aprovechan ciertas características metabólicas de algunos microorganismos que les permite realizar la degradación y transformación de agentes tóxicos o contaminantes en un ecosistema, Este método presenta un gran potencial en la recuperación de ambientes contaminados. Esta se centra en la exploración para el aprovechamiento de las características metabólicas (diversidad y versatilidad) de bacterias y hongos, con la finalidad de reducir los elementos tóxicos que pueden estar afectando severamente un área determinada, mitigando el efecto de dichos contaminantes. (Villaveces, 2019)

2.7 Mecanismos de Microorganismos para tratar Metales Pesados

Algunas especies microbiológicas presentes en la naturaleza tienen la capacidad de transformar elementos traza incluidos los metales, estos pueden gracias a estas características metabólicas modificar la concentración de metales pesados en el ambiente, se ha reportado en varios estudios que la capacidad de remoción de metales por bacterias, algas y hongos es mayor a la obtenida con métodos fisicoquímicos convencionales, otra ventaja de este método biológico es que suele ser selectivo. Dentro de los procesos de transformación de carácter enzimático de los metales desarrolladas por dichos microorganismos se puede mencionar 3: Oxidación, Reducción, Metilación Y la demetilación; las mismas que permiten obtener compuestos con baja solubilidad en agua o compuestos volátiles. Existen varios mecanismos bioquímicos llevados a cabo por los microorganismos para lograr la biorremediación de metales, entre los que se puede mencionar:.(Beltrán & Gómez, 2016)

2.7.1 Unión a metales, bioacumulación y biosorción

Los metales se ligan a la superficie de la célula por medio de: fuerzas de Van de Waals, interacciones electrostáticas, unión covalente, interacciones redox, precipitación extracelular, o también puede combinar estos; los grupos cargados negativamente que se encuentran en la pared de la célula de la bacteria u hongo permitiendo la adsorción de los iones metálicos permitiendo su retención. Si esto ocurre estos metales pueden bioacumularse. Se entiende a la bioacumulación como un proceso de la célula que implica el sistema de transporte de membrana ingresa el metal o toxico con gasto de energía, este gasto de energía se realiza a través de la H⁺-ATPasa; una vez que ha ingresado el metal al citoplasma, se logra el secuestro del mismo por proteínas con varios grupos sulfhidrilos las cuales son: metalotioneinas (MT), fitoquelatinas (FQ) y otros péptidos de unión a metales, en el caso de microorganismos del reino fungi esto ocurre en las vacuolas. (Beltrán & Gómez, 2016)

Las metalotioneinas poseen un rol muy importante en el metabolismo de estos metales y en el control del estrés microbiano. Estas son proteínas de bajo peso molecular, que permiten la interacción del microorganismo y el metal, cuando ocurre la unión entre ellos se hace más fácil la absorción y transformación del metal, actualmente, se aplica estas técnicas con la ayuda de la ingeniería genética. (Beltrán & Gómez, 2016).

La biosorción con el uso de la biomasa microbiana sea activa o inactiva con la finalidad de secuestrar metales, a través de la unión a las superficies celulares. Esto se da a por medio de procesos físicos y químicos por ejemplo la adsorción o el intercambio iónico. Esta técnica se ha aplicado con biomasa de varios microorganismos.

Algunos compuestos químicos presentes en las células, como el grupo acetamido de la quitina que es el polisacárido estructural de los hongos, grupos sulfhidrilos, ciertas proteínas, etc., pueden realizar la biosorción. Algunos metales son secuestrados efectivamente al unirse ciertas estructuras como los fosfatos, algunas proteínas y grasas en el citoplasma de la célula, a través de la competencia con los iones de Na, K y Ca en las funciones biológicas. Esta tecnología de biosorción comprende el acomplejamiento en superficie y la microprecipitación, estas son alternativas potenciales para reducir los metales contaminantes. (Beltrán & Gómez, 2016)

Se han aplicado ciertas bacterias y hongos como biosorbentes, estos han sido aislados de áreas contaminadas, y han mostrado tener los metales pesado, lo cual realizan en un tiempo muy corto, entrando en contacto con la disolución del metal, esto reduce significativamente el costo en el proceso de remediación, ya que no necesita agregar ningún tipo de nutriente, esto debido a que dicho organismo no requiere un metabolismo activo, es importante mencionar también que la biomasa es extraíble con facilidad de sistemas acuosos. Algunos biofiltros han sido elaborados con microorganismos como microalgas y bacterias se han usado con el fin de descontaminar ecosistemas con Cr y Cd, Esta biomasa microbiana se inmoviliza en materiales inertes, tales como silica, poliacrilamida, polimetano y polisulfona, etc., por esa razón estos han sido desde hace tiempo ampliamente utilizados en biorreactores. (Beltrán & Gómez, 2016)

2.7.2 Transformación de la valencia del metal

En dependencia del estado de oxidación de cada metal una bacteria, hongo o microalga, puede llevar a cabo dos posibles procesos de transformación, una es la movilización de dicho metal, por medio de transformar el estado insoluble que corresponde a una fase en estado sólido a un estado soluble final que sería a en fase acuosa, que corresponde a una fase en estado sólido a un estado soluble final que sería a en fase acuosa, esto es la lixiviación; también se puede

Inmovilizar el metal con el proceso contrario, en donde la fase inicial es soluble en fase acuosa y pasa a uno insoluble en fase sólida final.

La solubilidad y movilidad está en dependencia de su estado de oxidación y de su forma iónica. Los metales de diferentes valencias tienen una toxicidad variada; si se excretan enzimas redox especiales, los microorganismos tienen la capacidad de convertir el metal a otra forma de menor toxicidad. Las reacciones de óxido reducción están agrupadas en 2 grupos, las asimilatorias y las desasimilatorias; cuando hablamos de reacciones asimilatorias el metal está inmerso en las reacciones metabólicas del organismo haciendo el papel de receptor de los electrones; en cambio, en las reacciones desasimilatorias se desconoce el papel que puede tener dicho metal dentro del metabolismo del microorganismo e indirectamente inicia la reacción redox. Los microorganismos están en la capacidad de detoxificar metales a través del cambio en la valencia y e la reducción enzimática de un metal en procesos metabólicos que no se encuentran en relación con la asimilación del metal. Un ejemplo es en ciertas bacterias resistentes a Hg, en este tipo de bacterias se forma la proteína liasa organomercurial (MerB), que convierte el metilmercurio ($\text{CH}_3 \text{Hg}^+$) a Hg (II) que se considera de menor toxicidad. (Beltrán & Gómez, 2016)

2.7.3 Biometilación y mecanismo de volatilización

Este es un proceso de carácter biológico útil en la eliminación de metales y metaloides, este se lleva a cabo cuando estos son transformados a derivados metilados, los mismos que después son volatilizados, los derivados metilados pueden excretarse de forma rápida desde la célula y volatilizarse a formas con menor toxicidad. Algunos hongos y bacterias tienen la capacidad de ser utilizados como agentes metiladores, gracias a la materia orgánica que le provisiona una fuente de grupos metilo que les permite que se lleve a cabo este proceso.

Por ejemplo, en la metilación de Hg los iones de Hg (II) se metilan por la transferencia no enzimática de grupos metil desde la metilcobalamina lo que lo convierte en monometil o dimetil mercurio las mismas que han demostrado ser bastante móviles.

Hoy en día se conoce que la forma como los microorganismos transforman el mercurio es que sus células son resistentes al metal debido a una enzima que está en el citoplasma celular llamada mercurio reductasa (MerA) que es la encargada de pasar el Hg (II) a Hg (0) que se caracteriza porque es volátil y con menor toxicidad.

Actualmente, a la enzima (Mer A) se le ha considerado y estudiado por su potencia uso, ya que como se sabe puede ser una alternativa para mitigar el efecto nocivo del mercurio que es un contaminante ambiental muy agresivo para todo el ecosistema. La aplicación de este mecanismo permite que este sea inmovilizado, y por tanto ya no este biodisponible, su movilidad o remover el metal del suelo.

Aunque, esta estrategia que emplea microorganismos y remueve metales lo que hace es la reducción con la ayuda del metabolismo del microorganismo del ion mercurio Hg (II) a un mercurio metálico volátil Hg (0), luego el mercurio volátil reducido fluye y se diluye en la atmósfera, pero esto no siempre es posible con otros metales tóxicos. (Beltrán & Gómez, 2016)

2.7.4 Mecanismo de precipitación química extracelular

Algunos microorganismos tales como los hongos y bacterias tienen la capacidad metabólica de secretar productos bioquímicos de tipo inorgánico como iones sulfatos, carbonatos o fosfatos, los mismos que por su naturaleza química son capaces de precipitar iones metálicos tóxicos de forma no enzimática.

En la naturaleza algunos microorganismos tienen la capacidad de inmovilizan estos compuestos tóxicos por medio de la precipitación extracelular.

Varias sustancias ligadoras de metales son excretadas por hongos y bacterias, por ejemplo, algunos compuestos como, alcoholes, polisacáridos o ácidos húmicos y fúlvicos, por mencionar algunos. (Beltrán & Gómez, 2016)

2.7.5 Mecanismo simbiótico

Al hablar de mecanismo simbióticos se refiere al empleo de plantas y microorganismos en conjunto, para realizar una sinergia en la eficiencia de la extracción de contaminantes, a esto se lo conoce como rizorremediación.

Se ha reportado que al aplicar esa asociación resulta benéfico y es útil, debido a que, los hongos o bacterias reducen la biodisponibilidad de estos tóxicos, mientras que, las plantas actúan en extrayendo y removiendo dichas sustancias. (Beltrán & Gómez, 2016).

2.8. *Aspergillus niger*

Este es un hongo, clase Eurotiomycetes, orden Eurotiales, familia Thichocomaceae, genero *Aspergillus*, especie *Aspergillus Niger*; tiene un conidióforo cuyo diámetro es aproximadamente de uno a tres milímetros de largo, lo que le caracteriza a sus conidios es que siempre son de color negro, sus colonias se desarrollan en un tiempo corto, en 7 días llega a tener el tamaño de cuatro a cinco centímetros, las colonias en un inicio tienen el micelio de color blanco, posteriormente se hacen de color pardo o negro, se puede reconocer fácilmente por su apariencia de polvo.

En su reverso son de color gris y en ocasiones de color amarillo pálido. (Villaveces, 2019)

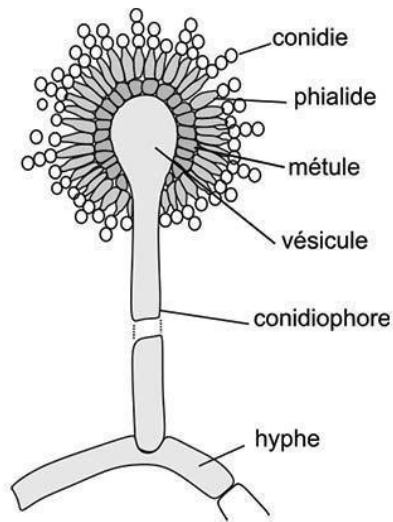


Figura N°8. *Aspergillus niger* (Rivera et al., 2015)

La temperatura que resiste para su desarrollo tiene un rango amplio es de 5 a 40 grados centígrados, temperaturas fuera de estos rangos ocasionan la reducción del crecimiento de la población, lo cual afectaría drásticamente a la eliminación del contaminante, generando un reducido o nulo resultado de micoremediación. (Villaveces, 2019)

El pH también se considera un factor importante, afortunadamente el rango de pH para su correcto desarrollo es de 3.5 a 6.8, lo que es bueno ya que se considera relativamente amplio, no son exigentes desde el punto de vista nutricional, sus nutrientes los toman de macro y micronutrientes presentes en el sustrato en el cual se desarrollan, por sus características este microorganismo tiene potencialidad como biorremediador ambiental, debido a que ha mostrado reducir los metales pesados y una alta tolerancia a concentraciones de varios de estos elementos, lo que hace que a este hongo se lo considere por su potencial uso para la micoremediación. (Hidalgo et al., 2020)

2.9 Pleurotus ostreatus

Es una seta con características variable. Posee un sombrerillo o parte superior cuyo tamaño es de cinco a 20 centímetros, en dependiente de la edad y de las condiciones que han permitido su desarrollo.

Su forma también depende es los factores antes mencionados, en un inicio es redonda y abombada, posteriormente, se abre y ensancha, su forma cambia de convexa a plana. Con el tiempo, el borde levanta y el conjunto termina cóncava como un plato. (Coello, 2011)

Algunos estudios se han enfocado en la capacidad este hongo para degradar contaminantes ambientales, estos microorganismos han mostrado ser efectivos, debido a que tienen la capacidad de producir una enzima extracelular llamada Lacasa, esta enzima es capaz de catalizar una reacción que degrada la lignina, un compuesto aromático. Para actuar como catalizador en estas reacciones la enzima necesita peróxido de hidrógeno, sustancia que el hongo tiene la capacidad de producir. (Rico et al., 2020)

La posible capacidad de este microorganismo de descomponer diversos contaminantes ambientales está siendo bien documentada en la actualidad. Según estudios se puede determinar a estos microorganismos como muy útiles como biorremediadores varios ambientes contaminados, especialmente suelos de industrias como las petroleras y mineras.

El uso de hongos en procesos de biorremediación puede ser ventajosos debido a que estos se encuentran en sedimentos acuáticos y en hábitats terrestres, y que sus hifas tienen la capacidad de ingresar en la tierra o suelo con contaminación y producir ciertas enzimas extracelulares para degradar estos contaminantes. Este hongo ha mostrado ser útil en la acumulación de algunos metales pesados como cadmio, cobre, mercurio, plomo y zinc.

(Santos et al., 2017)

Este tipo de microorganismo presenta un sistema enzimático extracelular que no ha mostrado especificidad, este tiene la capacidad de romper un número elevado de enlaces diferentes y, de esta forma destruir moléculas orgánicas. Dentro de las enzimas que constituyen el complejo multienzimático ligninolítico del hongo esta la casa. Esta enzima cataliza la oxidación, polimerización, depolimerización, metilación y/o dimetilación de estructuras fenólicas. (Santos et al., 2017)

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo constituye un estudio investigativo-experimental, las muestras de suelo fueron obtenidas de las zonas aledañas a la bocamina de una Industria minera ubicada en el cantón Zaruma- El Oro- Ecuador,, los inóculos de los hongos *Aspergillus niger* y *Pleurotus ostreatus* son procedentes del repositorio existente en el Laboratorio de Microbiología de Escuela Politécnica de Chimborazo, los resultados se han obtenidos mediante técnicas microbiológicas y de espectrofotometría de absorción atómica, desarrollados el Centro de Investigación Biotecnológica del Ecuador de la Politécnica del Litoral.

3.1. Variables.

Variables Dependientes:

Y Eficiencia de biorremediación de metales pesados: Cadmio y Plomo

Variables Independiente:

Y Hongo *Pleurotus ostreatus*

Y Hongo *Aspergillus niger*

3.2 Obtención de muestras de suelo

Los puntos de muestreo han sido seleccionados con base a una cuadrícula de 30 x 30 m diseñada sobre una topografía del área de la bocamina.

Se tomaron doce muestras en doce puntos diferentes dentro de la cuadrícula. En cada uno de los puntos de muestreo se procedió a con el equipo multiparámetro determinar los parámetros abióticos: la temperatura y el pH y a continuación utilizando instrumentos y bolsas esterilizadas,

se tomó una muestra de aproximadamente 1kg por punto, esto para tener suficiente cantidad y poder realizar repeticiones de análisis de cada metal.

En el laboratorio se procedió a retirar todo material extraño (ramas, piedras, escombros, basura), el remanente se homogenizó y pulverizó guardándose en bolsas esterilizadas.

3.3.1 Análisis Químico de las muestras de suelos

Se cuantificó el Cadmio y Plomo en las muestras de suelo ya homogenizadas y pulverizadas, para ello se utilizó previo tratamiento la técnica de Espectrofotometría de Absorción Atómica usando el estándar de 1000 mg L⁻¹ para cada uno de los elementos (Tiempo 0).

3.3.2 Desarrollo de hongos *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus niger*

Previo iniciar el tratamiento, se realizó la verificación de las muestras del suelo que se pretendían estudiar no contenga con antelación los microorganismos objeto del presente estudio, para lo cual se realizó el análisis microbiológico de las muestras de suelo antes de ser tratados.

Se diluyó 20 gramos de suelo y se colocó en 20 mililitros de agua estéril se homogeniza la mezcla; de aquí se toma 2 mililitros y se coloca en dos cajas de Petri con medio de cultivo Sabouraud Dextrose Agar, esto se realizó por triplicado y para cada uno de los hongos estudiados.

Posterior a ello, se incubaron a 25°C por una semana, al no haber desarrollo de hongos, esto nos indicó que el suelo podía ser tratado ya que no existía presencia de los hongos previamente en los suelos a tratar y por tanto se podía continuar con el estudio.

3.3.3 Preparación del Inoculo

Los hongos liofilizados procedentes *Pleurotus Ostreatus* y *Aspergillus niger* se transfirieron a cajas de Petri que contengan medio para cultivo SDA (5 de cada uno para cada

microorganismo) para su multiplicación. Los mismos se incubaron a veinte y cinco grados centígrados por un tiempo de una semana hasta que crezca y cubra el plato Petri por completo, posteriormente se esperó dos semanas después del crecimiento total de los micelios.

3.3.4 Tratamiento

Este procedimiento se realizó tanto para *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus niger*.

En doce tubos de ensayo se depositó un gramo de muestra de muestra, 6 tubos seleccionados para tratamiento 6 tubos para realizar el control. Es importante mencionar que a asignación del tratamiento en los tubos se realizó al azar. En el caso de aquellos tubos a los que se le aplico tratamiento, dos fueron rotulados a tiempo inicial o tiempo 0, dos para evaluación a los 15 días y los dos restantes para cuantificación a los 30 días. A estos tubos a los que se les aplicó tratamientos se les adicionó 5UFC/mL de hongo *Pleurotus ostreatus* o *Aspergillus niger* según sea el caso, que corresponde a 1cm de diámetro de las placas de Petri con los micelios obtenidos de los medios SDA, posteriormente tanto los tubos de tratamientos y controles se encubaron a T° ambiente de la ciudad de Guayaquil (Durante el transcurso del año, la temperatura generalmente varía de 21 °C a 31 °C)que es el lugar donde se realizó el estudio, y que además se asemeja a la temperatura ambiente del lugar de donde se tomaron las muestras que es el cantón Zaruma provincia del Oro.

Cuando se cumplió los 15 y 30 días respectivamente, se procedió a extraer y cuantificar el Cadmio y el mercurio de los tubos inoculados, con la finalidad de determinar si se ha reducido la concentración de estos metales en los tratamientos y controles.

Con el fin de realizar la verificación de la presencia de los hongos al final del estudio se volvió a realizar el análisis microbiológico de las muestras tanto de tratamiento como de control.

3.3.5 Extracción de Cadmio y Mercurio para cuantificarlos

3.3.5.1 Cadmio

El primer paso fue incinerar los crisoles en el horno por dos horas a 600 °C con la finalidad de retirar la humedad y cualquier componente orgánico y posteriormente se deja enfriar en el desecador.

En cada crisol se colocó 1g de suelo, se procede a registrar los gramos de la muestra junto con el crisol (P1) situándose en la mufla por un tiempo estimado de 18-20 horas a 110°C.

Se realiza el pesaje nuevamente (P2). Por diferencia de estos dos pesos se calcula el porcentaje de humedad.

A continuación, los crisoles que contienen las muestras de suelo se pusieron de nuevo en el horno por 3 horas a 600°C esto con la finalidad de dejar solo la parte inorgánica, luego se para al desecador hasta que se enfríe.

Una vez que se han enfriado, se transfieren las muestras de suelo de los crisoles a vasos de precipitación de seiscientos mililitros. Se procedió a añadir tres porciones de un mililitro de HCL concentrado a los crisoles para sacar todos los residuos de la muestra que posteriormente se transfirieron a los vasos de precipitación que contenían la muestra. A continuación, se añadió un mL de ácido nítrico a cada crisol y se pasó a cada vaso de precipitación, utilizando un vidrio reloj se taparon los vasos de precipitación, posteriormente se los calentó en “hot plate” a trescientos cincuenta grados centígrados por 15 minutos, luego enfriar hasta que alcance la temperatura ambiente y ahora es necesario añadir similares volúmenes de ácido clorhídrico y ácido nítrico, pero ahora de forma directa al beaker que contiene la muestra.

Se procedió a calentar otra vez el “hot plate”, se dejó enfriar para filtrar con papel filtro

N°40 y se coloca en matraces volumétricos de 100 mL.

Se lavó el residuo con ácido clorhídrico al 10% hasta que se observe transparente. El papel filtro se debe enjuagar en repetidas veces con Ácido clorhídrico al 10% hasta que se logre remover por completo el residuo. Una vez que se termina de filtrar en el matraz volumétrico se lleva a volumen con Ácido clorhídrico al diez por ciento, finalmente, el filtrado lo transferimos a frascos debidamente rotulados y se tapa antes de almacenarse, para llevarlo al equipo de Espectroscopia de absorción atómica y realizar su lectura.

3.3.5.2 Mercurio

Para extraer el mercurio de la muestra se trabajó de manera diferente a con el cadmio, debido a que las propiedades físicas del mercurio no permiten utilizar temperaturas por encima de los 100°C.

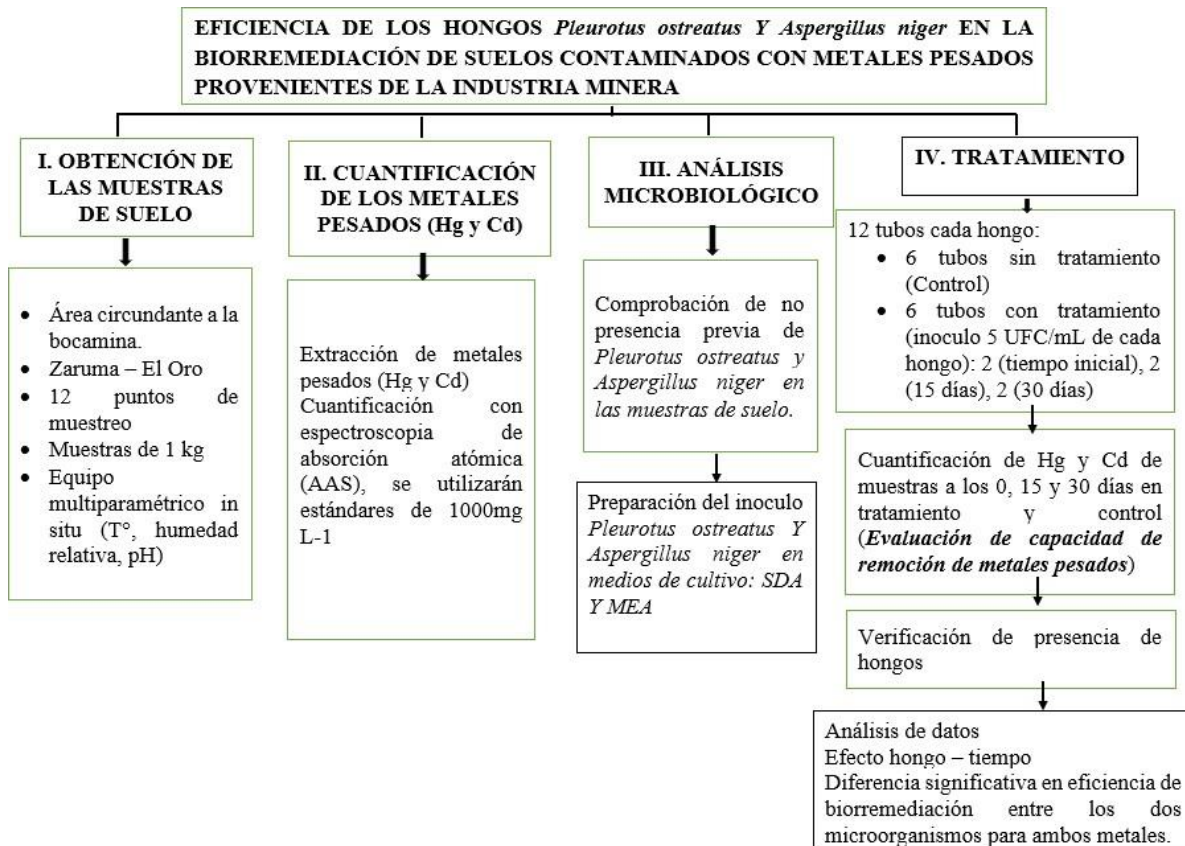
Primero pesamos 1.0 gramo de muestra de suelo y colocamos en un erlenmeyer de 50 mililitros, a esto se añadió 10 mililitros de Ácido nítrico concentrado HNO₃ y, posteriormente, estos se llevaron a digestión durante ocho horas a temperatura ambiente y en el interior de una campana de extracción. Antes de la digestión, se colocó en la boca de cada erlenmeyer, un pequeño embudo de vidrio, esto con el fin de evitar que la muestra se evapore, posteriormente se colocó en reflujo a sesenta grados centígrados por un tiempo de una hora, aumentando la T° lentamente hasta cien grados centígrados, durante 3 horas. Después de quitar el reflujo, se añadió 2,5 mililitros de ácido sulfúrico concentrado H₂SO₄, seguido de 1,0 mililitro de ácido clorhídrico concentrado HCL concentrado a cada muestra, posteriormente estas se colocaron de nuevo a 100°C por tres horas. Después de ese periodo de tiempo, se agregó Permanganato de potasio KMnO₄ (10% m/v), gota a gota, a cada muestra, hasta que una coloración rosada se quedó constante. Luego, se añadió

clorhidrato de hidroxilamina (50 µL, 10% m/v). Estas muestras digeridas se filtran en matraces aforados de 25 mL; luego se diluyen con agua desionizada. Se guardo las muestras para cuantificar el Hg total mediante la técnica de espectroscopia de absorción atómica al vapor frío.

3.3.6 Análisis de datos

De los datos obtenidos de los 6 tubos control y 6 tubos con se determinó el efecto de los hongos a base de tiempo, Luego se comparó los resultados de remoción de cadmio y Mercurio obtenidos en el tratamiento con cada hongo y se determinó cuál de los dos resultó más eficiente para reducir la concentración de estos metales pesados de los suelos estudiados.

3.3.7 Esquema de la metodología



CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Cuantificación de Mercurio en Suelos con tratamiento Con *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus niger*

Cuadro N°4. Concentración de Mercurio (mg/Kg) en Suelos tratados con *Pleurotus Ostreatus*

	MUESTRA 1	MUESTRA 2	MEDIA	DESVIACION ESTANDAR	VALOR MAXIMO PERMISIBLE (zona industrial)
TIEMPO 0 DIAS	53,3	49,6	51,45	2,62	10
TIEMPO 15 DIAS	40,6	39,2	39,9	0,99	10
TIEMPO 30 DIAS	32,1	30,4	31,25	1,20	10

Cuadro N°5. Concentración de Mercurio (mg/Kg) en Suelos tratados con *Aspergillus Niger*

	MUESTRA 1	MUESTRA 2	MEDIA	DESVIACION ESTANDAR	VALOR MAXIMO PERMISIBLE (zona industrial)
TIEMPO 0 DIAS	55,3	53,1	54,2	1,56	10
TIEMPO 15 DIAS	50,6	49,5	50,05	0,78	10
TIEMPO 30 DIAS	47,4	46,7	47,05	0,49	10

Cuadro N°6. Concentración de Mercurio (mg/Kg) en Suelos sin tratamiento (Control)

	MUESTRA 1	MUESTRA 2	MEDIA	DESVIACION ESTANDAR	VALOR MAXIMO PERMISIBLE (zona industrial)
TIEMPO 0 DIAS	55,6	51,2	53,4	3,11	10
TIEMPO 15 DIAS	52,2	50,3	51,25	1,34	10
TIEMPO 30 DIAS	46,2	47,6	46,9	0,99	10

4.2 Cuantificación de Cadmio con tratamiento con *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus niger*

Cuadro N°7. Concentración de Cadmio (mg/Kg) en suelos tratados con *Pleurotus ostreatus*

	MUESTRA 1	MUESTRA 2	MEDIA	DESVIACION ESTANDAR	VALOR MAXIMO PERMISIBLE (zona industrial)
TIEMPO 0 DIAS	37,2	38,9	38,05	1,20	10
TIEMPO 15 DIAS	32,1	30,9	31,5	0,85	10
TIEMPO 30 DIAS	26,4	24,8	25,6	1,13	10

Cuadro N°8. Concentración de Cadmio (mg/Kg) en suelos tratados con *Aspergillus niger*

	MUESTRA 1	MUESTRA 2	MEDIA	DESVIACION ESTANDAR	VALOR MAXIMO PERMISIBLE (zona industrial)
TIEMPO 0 DIAS	39,1	39,2	39,15	0,07	10
TIEMPO 15 DIAS	28,1	27,3	27,7	0,57	10
TIEMPO 30 DIAS	19,8	19,2	19,5	0,42	10

Cuadro N°9. Concentración de Cadmio (mg/Kg) en suelos sin tratamiento (control)

	MUESTRA 1	MUESTRA 2	MEDIA	DESVIACION ESTANDAR	VALOR MAXIMO PERMISIBLE (zona industrial)
TIEMPO 0 DIAS	39,5	38,9	39,2	0,42	10
TIEMPO 15 DIAS	39,2	38,3	38,75	0,64	10
TIEMPO 30 DIAS	39,2	38,1	38,65	0,78	10

4.3. Discusión

De acuerdo con los datos obtenidos las concentraciones en los suelos aledaños a una industria minera del cantón Zaruma de la provincia de El Oro sin ningún tipo de tratamiento son de mercurio: 51,45 – 54,2 mg/Kg y Cadmio de 38,05 – 39,15 mg/Kg, el nivel máximo permisible para un área industrial de dichos metales pesados es 10 mg/Kg respectivamente, por tanto, se evidencia que estos suelos presentan niveles que están muy por encima de los límites que especifica la normativa nacional e internacional, esto como residuo de la cianuración y los relaves de la amalgama que realizan como procedimiento para extraer el oro en estos sitio, estos resultados coinciden con los obtenidos por la Fundación de Salud Ambiente y desarrollo, quienes analizaron los relaves de ciertas parroquias de Zaruma y Portovelo, en cuyo estudio demostraron que las concentraciones de plomo es de 1796,8 – 4060,0 mg/Kg, arsénico: 396,0 – 8800,0 mg/Kg, zinc 513,0 – 2670,0 mg/Kg, cadmio 27.0 - 44.1 mg/Kg, y mercurio 10,0 – 35,9 mg/Kg, se encontraban alarmantemente altos con respecto a los valores máximos permisible señalados en la norma de calidad ambiental del recurso suelo y criterios de remediación para suelos contaminados, esto demuestra que ciertas empresas mineras de esta zona constituye una fuente de contaminación, ya que con esos resultados es evidente que no actúan con responsabilidad social y por tanto no realizan un manejo adecuado de desechos ocasionado graves daños al ecosistema y a afectando la salud de todos quienes habitan en este sector y su zona de influencia.

Como se evidencia en las Cuadros 4 y 5 al cuantificar la concentración de mercurio en el suelo tratado con *Pleurotus ostreatus* se logró una reducción de 51,45 a 31,25 mg/Kg; mientras que, el suelo tratado con *Aspergillus niger* redujo de 54,2 a 47,05 mg/Kg, esto demuestra que para el caso del mercurio el microorganismo que actuó mejor como biorremediador es el hongo *Pleurotus ostreatus*, estos resultados coinciden con los obtenidos por Coello en 2011, quien

determinó que el hongo *Pleurotus ostreatus* es capaz de reducir algunos metales pesados, siendo efectivo para plomo y mercurio especialmente; mientras que en la investigación desarrollada por Villaveces en 2019 cuyos resultados permitieron determinar que el hongo *Aspergillus niger* es eficiente en la reducción de contaminantes ambientales como metales de alto peso molecular, los mecanismos utilizados por el microorganismo fueron biosorción, bioacumulación, o la biotransformación (gracias al metabolismo de este los iones metálicos fueron reducidos) cuya eficiencia de remoción fue mayor para metales como el Cr, Cd y Pb.

Al analizar la concentración de Cadmio en los suelos con tratamiento con los dos diferentes microorganismos se puede establecer que con el hongo *Pleurotus ostreatus* redujo de 38,05 mg/Kg a 25,05 mg/Kg; mientras que, con *Aspergillus niger* disminuyó este metal de 39,15 a 19,5 mg/Kg, demostrándose mayor eficiencia de biorremediación en el segundo hongo; estos resultados se correlacionan con los obtenidos por Apaza en 2020 quien determinó que *Aspergillus niger* es un excelente biorremediador para la remoción de Cadmio, ya que este en un medio tóxico empieza a sintetizar mayores cantidades de metalotioneínas para quelar los metales pesados, estas propiedades hicieron posible en su estudio realizar la remoción de plomo (II) y cadmio (II) de un suelo contaminado.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- En el presente estudio se determinó que los suelos estudiado correspondientes a una zona minera del cantón Zaruma, provincia de El Oro, se encuentran altamente contaminados, la concentración de mercurio y Cadmio determinados fueron de 51,45 a 54,2 mg/Kg y de 38,05 a 39,15 mg/Kg respectivamente, ambos valores superan por mucho a la concentración máxima permitida por la legislación ambiental vigente que es de 10 mg/Kg, por tanto se puede decir que, la industria minera en esta zona produce desechos tóxicos, subproducto de procesos mineros de relaves y escombros, como el mercurio y cadmio, los cuales son enviados al ambiente sin ser tratados en forma adecuada y constituyen un contaminante ambiental peligroso que está afectando gravemente al ecosistema y a la salud de quienes habitan en el lugar.

- Se realizaron las pruebas microbiológicas para el óptimo desarrollo de los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus niger*, determinándose que ambos microorganismos no son exigentes en cuanto a nutrientes y a factores ambientales como pH, temperatura y humedad, lo cual le permite habituarse fácilmente, esto permite que este método biológico pueda ser aplicable y sostenible en el tiempo.

- Se evaluó la eficiencia de los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus niger* en la biorremediación de suelos con elevados niveles de dos metales pesados: Mercurio y Cadmio, provenientes de una industria minera del cantón Zaruma, a través de métodos microbiológicos y

espectroscopia de absorción atómica, estableciéndose que el microorganismo que mejor actúa en la reducción de Mercurio es *Pleurotus ostreatus*, logrando una disminución de la concentración de este metal de 19,93 mg/Kg; mientras que, el suelo tratado con *Aspergillus niger* redujo 7,15 mg/Kg; en ambos casos se logró reducir la concentración del metal; por otro lado, en cuanto al Cadmio se determinó que *Pleurotus ostreatus* redujo 13 mg/Kg de la concentración del metal en el suelo estudiado; mientras que, con *Aspergillus niger* disminuyó este metal 19,65 mg/Kg, demostrándose mayor eficiencia en el hongo *Aspergillus niger*. Con estos resultados se demuestra la utilidad de los microorganismos en procesos de remediación ambiental.

- Este estudio permitió demostrar que el uso de la biotecnología ambiental con el uso de agentes biológicos como los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus niger* es una alternativa viable, sostenible y económica que permitiría recuperar suelos altamente contaminados con metales pesados.

5.2. RECOMENDACIONES

- Se recomienda continuar realizando nuevas investigaciones con otros tipos de bacterias y hongos, para determinar si poseen cualidades metabólicas que les permita actuar como biorremediadores, ya que como se evidencio en el presente trabajo, los microorganismos tienen un gran potencial dentro de la biotecnología ambiental.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberto, L. (2008). *Determinación De Mercurio En Suelos Del Sector Minero Las Claritas, Estado Bolívar, Mediante Proceso.*
<http://www.redalyc.org/pdf/4277/427739435011.pdf>
- Banco Central del Ecuador. (2015). La Minería ecuatoriana. *Boletín Científico*, 2(4).
<https://doi.org/10.29057/esat.v2i4.1469>
- Beltrán, M., & Gómez, A. (2016). Biorremediación de metales pesados cadmio (Cd), cromo (Cr) y mercurio (Hg), mecanismos bioquímicos e ingeniería genética: una revisión. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 12(2), 172–197.
<https://doi.org/10.18359/rfcb.2027>
- Calderón, P. (2020). *Estado actual de la minería del oro en Ecuador: gran minería vs minería artesanal* [(Tesis de maestría)Universidad Politécnica de Cataluña].
[https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/335984/TFM_PAOLA CALDERON%2013-11-2020%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2117/335984/TFM_PAOLA%20CALDERON%2013-11-2020%29.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Castelo, M. (2015). *Determinación de Arsénico y Mercurio en agua de consumo del cantón Rumiñahui por Espectrofotometría de Absorción Atómica Disertación: Vol. II.* (Tesis de maestría) Universidad Católica del Ecuador.
- Ccolqqe, E. (2019). Contaminación Minera en el Área Sur-Medio del Perú por la Minería del Oro a Pequeña Escala. In *Artículos universitarios*. (Tesis de maestría) Universidad Politécnica de Cataluña.
- Chanagá, X., Plácido, J., Marín, M., & Yepes, M. (2012). Hongos Nativos con Potencial Degradador de Tintes Industriales en el Valle de Aburrá, Colombia Native Fungi with Industrial Dye Degrading Potential in the Aburrá Valley, Colombia. *Revista Facultad*

Nacional Agronomía de Medellín, 65(2), 6811–6821. <http://www.mycobank.org/>

- Coello, J. (2011). Aplicación del hongo *Pleurotus ostreatus* como alternativa para la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados. In *Espol*. (Tesis de Pregrado) Escuela Politécnica del Litoral.
- Guerrero, M., & Pineda, V. (2016). Contaminación del suelo en la zona minera de Rasgatá Bajo (Tausa). Modelo conceptual. *Ciencia e Ingeniería Neogranadina*, 26(1), 57. <https://doi.org/10.18359/rcin.1664>
- Güiza, L. (2019). La Minería Manual En Colombia: Una Comparación Con América Latina / Manual Mining in Colombia: A Comparison with Other Countries in Latin America. *Boletín de Ciencias de La Tierra*, 35, 37.
<http://ezproxy.unal.edu.co/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edssci&AN=edssci.S0120.36302014000100005&lang=es&site=eds-live&scope=cite>
- Hidalgo, N., Mamani, A., Mestre, A., Fernandez, P., & Bustos, D. (2020). Biosorción de plomo por biomasa de origen fúngico aislada a partir de desechos mineros de la mina Hualilán, Argentina. *Serie Correlación Geológica*, 36(1–2), 39–52.
http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1666-94792020000100039&lang=es
- Laricano, E. (2018). *Análisis comparativo de la biorremediación de suelos contaminados con mercurio por actividad minera, aplicando la tecnología de vermicomposta* [(tesis de maestría) Universidad Nacional de Altiplano].
http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/9408/Rosa_Enriquez_Yuca.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- Marambio, J. (2019). Proyecto de descentralización de las Políticas de drogas en los Países Andinos. *Consep*, 2. [http://www.cicad.oas.org/fortalecimiento_institucional/savia/PDF/canton Francisco de Orellana.pdf](http://www.cicad.oas.org/fortalecimiento_institucional/savia/PDF/canton_Francisco_de_Orellana.pdf)
- Marcano, T. (2013). La Contaminación Con Cadmio En Suelos Agrícolas. *Venesuelos*, 8, 42–47. <http://venesuelos.org.ve/index.php/venesuelos/article/view/69>
- Maroneze, M., Vieira, J., Queiroz, M. ., & Jacob, E. (2014). Biodegradation of nitroaromatic compounds in Red Water by white rot fungi *Pleurotus ostreatus* and *floridae*. *Revista Ambiente e Agua*, 9(3), 445–458. <https://doi.org/10.4136/1980-993X>
- Morocho, J., & Puente, B. (2019). *Determinación de la concentración de cadmio en suelo urbano y vegetación de Cuenca por espectrometría ICP y cálculo del riesgo de exposición a la población*. (Tesis tercer nivel) Universidad Politécnica Salesiana.
- Rico, J., Ignacio, J., Mondragón, P., & Sánchez, J. (2020). Recuperación de un suelo contaminado por una mezcla de hidrocarburos. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 11(2), 75–83. <https://doi.org/10.36610/j.jsars.2020.110200075>
- Rivera, E., Cárdenas, J., Martínez, V., & Acosta, I. (2015). Remoción de cromo (VI) por una cepa de *Aspergillus Niger* resistente a cromato. *Informacion Tecnologica*, 26(4), 13–20. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642015000400003>
- Rodriguez, A., & Meléndez, D. (2019). “ *Eficiencia de *Lentinus edodes* , *Pleurotus ostreatus* y *Agaricus bisporus* para la remediación de suelos contaminados por plomo y cadmio proveniente de La Oroya antigua , Lima - Perú , 2019 .*” http://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12692/48865/Rodriguez_FAE-Melendez_CDZ-SD.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- Santos, E., Vargas, J., Cárdenas, J., & Acosta, I. (2017). Remoción de Arsénico (V) en Solución Acuosa por Biomasa Modificada del Hongo Aspergillus niger Removal of Arsenic / V) in Aqueous Solution by Modified Fungal Biomass of Aspergillus niger. *Información Tecnológica*, 28(V), 45–52.
<https://scielo.conicyt.cl/pdf/infotec/v28n6/art06.pdf>
- Viana, R. (2018). Minería en America Latina y el Caribe: Un enfoque socioambiental. *U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 21(2), 617–631.
- Villaveces, C. (2019). *Biorremediación usando el hongo aspergillus niger en el tratamiento de aguas residuales.* 1–23.
<https://repository.unimilitar.edu.co/bitstream/handle/10654/32776/VillavecesPalacioCarlosDaniel2019.pdf.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

ANEXOS

Anexo 1.

Tamizaje



Anexo 2.

Extracción de metales pesados



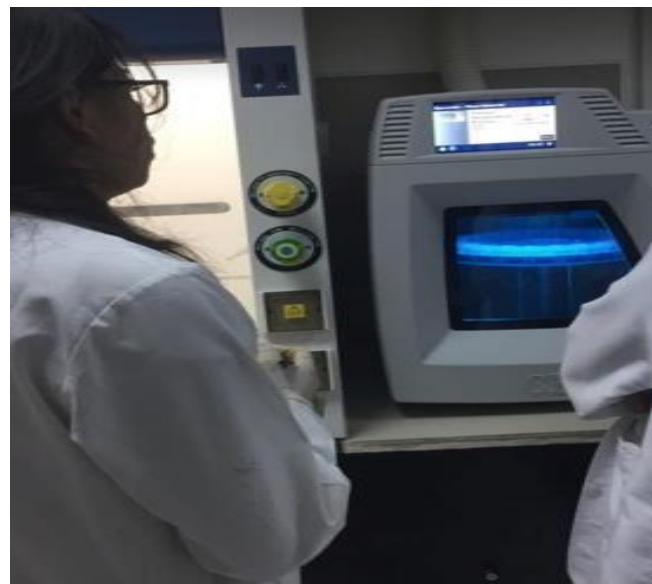
Anexo 3.

Tratamiento de muestras



Anexo 4.

Cuantificación de metales pesados



Anexo 5.

Aspergillus niger



Anexo 6.

Pleurotus ostreatus

