



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

Determinación de la capacidad de remoción de cadmio y plomo por hongos de la podredumbre blanca *Pleurotus Ostreatus* en suelos de la Zona el TIMBRE Cantón QUININDE.

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORA: LEMACHE PÉREZ ENITT BIBIANA

TUTOR: DR. FAUSTO YAULEMA

Riobamba – Ecuador

2017

©2017, Emite Bibiana Lemache Pérez.

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo citas bibliográficas del documento, siempre y cuando se reconozca el derecho del Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

El Tribunal de Trabajo de Titulación certifica que; el trabajo de investigación: Determinación de la capacidad de remoción de cadmio y plomo por hongos de la podredumbre blanca *Pleurotus ostreatus* en suelos de la Zona el Timbre Cantón Quinindé, de responsabilidad de la señorita Enitt Bibiana Lemache Pérez, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

NOMBRE

FIRMA

FECHA

DR: FAUSTO YAULEMA

DIRECTOR DEL TRABAJO

DE TITULACIÓN

DR: JULIO IDROVO

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Enitt Bibiana Lemache Pérez, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos utilizados en el documento que proviene de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora; asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba, 16 de noviembre del 2017.

Enitt Bibiana Lemache Pérez

C.I. 060520007-0

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios y a mis padres quienes han forjado mi camino por el sendero correcto, también un sincero agradecimiento a la Dra. Norma Erazo, Dr. Julio Idrovo y al Dr. Fausto Yaulema quienes me han dado la oportunidad de realizar mi proyecto de investigación en el laboratorio de Biotecnología Ambiental, con confianza, respeto y paciencia.

Agradezco también al laboratorio de Agronomía de la Facultad de Recursos Naturales y a todas las personas que directamente me colaboraron durante toda mi investigación:

Enitt

DEDICATORIA

Este trabajo de titulación está dedicado a mis padres, Omar Lemache y Margarita Pérez a mis abuelitos Manuel Lemache y Clara Tixi, quienes con esfuerzo han apoyado mi carrera a seguir, y a mis hermanos, Andrea, Camilo, Alejandra y Maite que siempre han permanecido a mi lado en los momentos más difíciles de mi vida, a mis amigos que incondicionalmente han compartido alegrías y tristezas durante mi vida estudiantil Fredy, Paola, Lizeth, Yady, Carlos y Rosita.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
INTRODUCCIÓN	1
IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA.....	1
JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	1
OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	2
CAPITULO I	
1. MARCO TEORICO.....	3
1.1 Antecedentes de la Investigación	3
1.2 Contaminación de suelos por plaguicidas	3
1.3 Persistencia de plaguicidas en el suelo.....	4
1.4 Producción de metabolitos tóxicos.....	4
1.5 Influencia de los plaguicidas en la microflora del suelo.	4
1.6 Incidencia de los plaguicidas en el suelo.	4
1.7 Riesgos para la agricultura.	4
1.8 Riesgos para el medio ambiente.....	5
1.9 Contaminación de suelos agrícolas por metales pesados.	5
1.10 Plomo	6
1.11 Cadmio	6
1.12 Metales pesados y elementos traza.....	7
1.13 Poder depurador de los suelos.....	8
1.14 Contaminación de los suelos por elementos traza.....	9
1.15 La movilidad de los contaminantes y los parámetros geográficos.....	10
1.16 Biorremediación.....	13
1.16.1 Métodos de biorremediación.....	14
1.17 Aplicaciones de hongos en tratamientos de biodescontaminación.	15
1.18 Hongos ligninolíticos y compuestos xenobióticos.	16
1.19 Lacasa.....	16
1.19.1 Importancia de los hongos en la naturaleza.	17
1.19.2 Descripción botánica del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i>	17
1.19.3 Características del <i>Pleurotus</i> sp.....	18
1.19.4 Generalidades sobre el cultivo	19
1.19.5 Siembra o incubación.....	19
1.19.6 Fructificación	19

1.19.7	Condiciones ambientales para el crecimiento de los hongos	20
1.19.7.1	Temperatura	20
1.19.7.2	Concentración de iones hidrógeno	20
1.19.7.3	Aireación.....	21
1.19.7.4	Humedad.....	21
1.19.7.5	Luz	21
CAPITULO II		
2.	METODOLOGÍA.....	23
2.1	Tipo de investigación.....	23
2.2	Lugar de investigación.....	23
2.2.1	Lógica de la investigación.....	25
2.2.2	Esquema de la investigación.....	26
2.2.3	Variables de control.....	26
2.3	Procedimiento.....	27
2.3.1	Reactivación de la Cepa <i>Pleurotus ostreatus</i>	27
2.3.2	Preparación de inóculos	28
2.3.3	Preparación del sustrato	30
2.3.4	Toma de muestras y caracterización del suelo.....	32
2.3.5	Muestreo en calicatas	32
2.3.6	Preparación de las muestras de suelo.....	33
2.3.7	Métodos.....	34
2.4	Preparación de las macetas de remoción de metales pesados.....	34
2.4.1	Preparación de los tratamientos de remoción de metales.....	34
2.4.2	Control de parámetros en los tratamientos.....	36
2.4.3.	Control de crecimiento del hongo.....	37
CAPITULO III		
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
3.1	RESULTADOS.....	38
3.2	DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES		47
RECOMENDACIONES		48
BIBLIOGRAFÍA		
ANEXOS		

ÍNDICE DE TABLAS

N°		Páginas
Tabla 1-1:	Concentraciones geoquímicas normales y anómalas en suelos	7
Tabla 2-1:	Área superficial típica de minerales del suelo	11
Tabla 3-1:	Punto cero de carga (PZC) superficial	12
Tabla 4-1:	Rango óptimo de los principales factores que afectan el crecimiento de las especies del genero <i>Pleurotus</i>	22
Tabla 1-2:	Variables de control	26
Tabla 2-2:	Reactivación de la Cepa <i>Pleurotus ostreatus</i>	27
Tabla 3-2:	Preparación de inóculos	28
Tabla 4-2:	Preparación del sustrato	30
Tabla 5-2:	Métodos para la determinación de los parámetros del suelo	34
Tabla 1-3:	Caracterización inicial del suelo contaminado	38
Tabla 2-3:	Resultados finales del suelo contaminado	38
Tabla 3-3:	Resultados finales de la eficiencia de remoción de metales en el suelo	39
Tabla 4-3:	Resultados de control de la temperatura.	39
Tabla 5-3:	Resultados de control de pH.	40
Tabla 6-3:	Resultados de control de la humedad.	40
Tabla 7-3:	Crecimiento del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> (cm).	41
Tabla 8-3:	Remoción de metales en el suelo	42
Tabla 9-3:	Análisis T para muestras iguales, suponiendo varianzas iguales	42
Tabla 10-3:	Prueba F para varianzas de dos muestras	44
Tabla 11-3:	Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales	44

ÍNDICE DE FIGURAS

N°	Páginas
Gráfico 1-3: Evaluación del crecimiento del hongo	45

INDICE DE ECUACIONES

N°	Ecuación N° 1-2	Fórmula para la determinación de humedad	Paginas
			36

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A	REACTIVACIÓN DE LA CEPA <i>Pleurotus ostreatus</i>
Anexo B	MASIFICACIÓN DE LA CEPA MICROBIANA EN TRIGO
Anexo C	MASIFICACIÓN DE LA CEPA MICROBIANA EN LOS RESIDUOS DE CASCARA DE CACAO Y TAMO DE CEBADA
Anexo D	MUESTREO DE SUELOS EN LA ZONA EL TIMBRE
Anexo E	ARMADO DE LAS MACETAS PARA LOS TRATAMIENTOS DE SUELO CONTAMINADO
Anexo F	OTROS ANALISIS

RESUMEN

Se realizó la efectividad del hongo *Pleurotus ostreatus* como removedor de concentraciones de metales pesados en suelos de la zona el Timbre del Cantón Quinindé, realizados en el laboratorio de Biotecnología Ambiental de la ESPOCH. La metodología experimental aplicada empieza con la masificación del hongo en los sustratos de cascara de cacao y tamo de cebada. El suelo de prueba obtenido no recibió ningún tratamiento de esterilización y posteriormente se dispusieron en 6 celdas de suelo agrícola donde se realizó los debidos tratamientos con el respectivo sustrato y hongo utilizado en forma simultánea, el trabajo de investigación tuvo aproximadamente una duración de tres meses tomando en cuenta los debidos controles de humedad, pH y temperatura pasando un día. Mediante los resultados obtenidos se indicó que el hongo *Pleurotus ostreatus* con el sustrato de cacao tiene la capacidad de remover hasta un 90,9 % de cadmio y 55 % de plomo mientras que con el sustrato de cebada remueve 89,20 % de cadmio y 44,5 % de plomo y por lo tanto el crecimiento del hongo se basa especialmente en el sustrato utilizado, en este caso no hay una diferencia significativa entre los dos sustratos. Estos porcentajes de disminución de su concentración inicial fueron validados con el análisis estadístico t student para dos muestras iguales. En conclusión, los resultados realmente satisfactorios se dio en la remoción del cadmio, más que del plomo, con el sustrato de cacao logrando que los valores iniciales medidos regresen a sus valores normales de los límites permitidos de metales pesados, según la Legislación Ambiental vigente en el Ecuador, siendo así el hongo *Pleurotus ostreatus* un eficiente microorganismo capaz de remover altas concentraciones de cadmio y plomo en suelos. Se recomienda realizar una debida homogenización al suelo de prueba.

Palabras clave: <BIOTECNOLOGÍA>, <MICROBIOLOGÍA>, <SETA *Pleurotus ostreatus*>, <PLOMO (Pb)>, <CADMIO (Cd)>, <REMOCIÓN>, <CACAO (SUSTRATO)>, <CEBADA (SUSTRATO)>.

ABSTRACT

The effectiveness of the mushroom *Pleurotus ostreatus* has been shown as a remover of heavy metal concentrations in soils of the Timbre area from Quinindé canton, it was carried out in the Environmental Biotechnology Laboratory at ESPOCH. The applied experimental methodology begins with the mushroom growth in the substrates of cocoa husk and barley chaff. The test soil obtained did not receive any sterilization treatment and later they were arranged in six cells of agricultural soil where the proper treatments were carried out with the respective substrate and mushroom used simultaneously. The research work lasted approximately three months taking into account the proper humidity, pH and temperature controls after one day. The results obtained indicated that the mushroom *Pleurotus ostreatus* with the cocoa substrate has the capacity to remove up to 90.9% of cadmium and 55 % lead. While with the barley substrate, it removes 89.20 % cadmium and 44.5 % lead. Therefore, the mushroom growth is based especially on the substrate used; in this case, there is no significant difference between the two substrates. These percentages of decrease of their initial concentration were validated with the statistical analysis t student for two equal samples. In conclusion, the satisfactory results were in the removal of cadmium, rather than lead, with the cocoa substrate achieving that the measured initial values return to their normal values of the permitted limits of heavy metals, according to the current Environmental Legislation in Ecuador. This is the mushroom *Pleurotus ostreatus* an efficient microorganism capable of removing high concentrations of cadmium and lead in soils. It is recommended to perform a proper homogenization to the test soil.

Keywords: Biotechnology, Microbiology, Mushroom *Pleurotus ostreatus*, Lead, Cadmium, Removal, Cocoa (substrate), Barley (substrate).

INTRODUCCIÓN

IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

El deterioro de los suelos produce efectos desfavorables en el medio ambiente y perjudica de la misma manera a países pobres y ricos, por lo que los más afectados por este problema serán las comunidades más vulnerables y una de ellas es la zona del Timbre en el cual existen 28.928 habitantes, siendo la zona más poblada ubicada en el Cantón “QUININDE” perteneciente a la provincia de Esmeraldas.

Debido a que existe presencia de metales pesados ocasionados por la fumigación al aire libre de plaguicidas y fungicidas en la zona, entre los cuales se encuentran el plomo con un 25 (ppm) y cadmio con el 3,32 (ppm) sobrepasando los límites permisibles, debido a que unos años atrás realizaban plantaciones de banano a gran escala, por ello se asume que son los causantes de producir degradación del suelo y por lo tanto a la siembra de productos, como ejemplo se puede citar los pimientos conteniendo elevadas concentraciones de metales pesados en las raíces de las plantas, ocasionando daños en la salud de las personas de la zona por las altas concentraciones de cadmio y plomo, por lo que principalmente se ve afecta la economía de la misma no permitiendo su consumo ni su libre expendió de estos productos en el mercado.

Este sector a pesar de contar con una gran cantidad de hectáreas que se dedican a la producción agrícola no cuenta con métodos de biorremediación de suelos, ni tampoco cuentan con un plan de manejo en suelos agrícolas.

JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Los metales pesados presentes en los suelos producto de actividades agrícolas, tales como la utilización de plaguicidas, fungicidas, fertilizantes, entre otros, se han convertido en un serio problema en los ecosistemas y en la salud de las personas del sector el Timbre puesto que contienen cadmio y plomo. En estos suelos a diferencia de otros tipos de compuestos que contaminan el medio ambiente presentan una dificultad para remover los metales pesados de lugares contaminados por su imposibilidad última de su destrucción o biodegradación, debido a su naturaleza química. Por lo tanto, es importante el desarrollo de nuevas tecnologías de descontaminación para dichos contaminantes y que además se establezca químicamente este compuesto. Dichas tecnologías toman importancia en especial cuando sean poco invasoras en el ambiente. Tal es el caso de uso de hongos de la podredumbre blanca, que sirve como una herramienta multifuncional en los procesos de detoxificación, esto se debe a muchas

características, tales como la hipertolerancia y acumulación de metales pesados, dado que el hongo *Pleurotus ostreatus* cuenta con una presencia de diferentes sistemas enzimáticos para la degradación de compuestos xenobióticos y con su vigoroso crecimiento permite a través del desarrollo de su micelio colonizar diferentes áreas y así acceder a los compuestos que constituyen las contaminaciones más frecuentes en las aguas y suelos.

Anteriormente el presente estudio experimental, evalúa a los hongos de la podredumbre blanca, *Pleurotus ostreatus*, como bioabsorbente de cadmio y plomo, teniendo en cuenta una selección de una cepa hipertolerante hacia los dos metales, estas concentraciones de cadmio y plomo en suelos se determinarán por el método de espectrofotometría de absorción atómica por lo que se disminuirá costos en los posibles métodos de biorremediación.

El estudio de la calidad del suelo del sector hará que se identifique las propiedades de la misma y por lo que se pueda establecer una posible propuesta que ayude a optimizar el uso y aprovechamiento de este recurso para mejorar la salud de las personas y la economía del lugar.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo General

- Determinar la capacidad de remoción de cadmio y plomo en suelos empleando el hongo de la podredumbre blanca *Pleurotus ostreatus*.

Objetivos específicos

- Comprobar la eficacia como removedor del hongo *Pleurotus ostreatus* en suelos contaminados con cadmio y plomo en el laboratorio.
- Evaluar la efectividad del sustrato utilizando residuos de cascara de cacao y tamo de cebada para el crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus*.
- Determinar el comportamiento de *Pleurotus ostreatus* ante cada metal pesado estudiado.

CAPITULO I

1. MARCO TEORICO

1.1 Antecedentes de la Investigación

Actualmente en la zona del Timbre Cantón “Quinindé” no se han realizado estudios acerca de la remoción de metales pesados en suelos y de ningún otro tipo; únicamente se cuenta con los análisis realizados anteriormente en plantaciones de pimientos, y por medio de este se determinó que existe una elevada concentración de cadmio y plomo en toda la producción de la Zona del Timbre. Por esta razón, el estudio a realizarse será el primero, representando una gran importancia para la zona que se va a beneficiar con esta investigación, ya que permitirá mejorar la calidad de producción agrícola y la calidad de vida de las personas, y también mejorando así sus condiciones sociales en el lugar.

1.2 Contaminación de suelos por plaguicidas

Los plaguicidas son aquellos compuestos químicos los cuales son utilizados para eliminar todo tipo de microorganismos. Por su actividad biológica estos plaguicidas se clasifican en fungicidas, insecticidas, herbicidas y rodenticidas de acuerdo a su toxicidad pueden ser para todo tipo de hongos, insectos, plagas, hierbas o algún tipo de roedores, a estos se suman algunos que son atrayentes, repentes y algunos esterilizantes de insectos.

De acuerdo a su naturaleza química estos suelen clasificarse en orgánicos e inorgánicos. Los orgánicos se han desarrollado en una extensa gama de aquellos productos que ocasionan problemas al suelo y al medio ambiente, en tanto los inorgánicos no suelen tener tanta toxicidad en el medio ambiente (Martín, Camazano,1984).

Tomando en cuenta varias condiciones de estos compuestos que se han utilizado algunos de ellos han sido demasiado estables que poco a poco han causado una gran contaminación al medio ambiente sobre todo al recurso suelo, teniendo en cuenta su alta toxicidad de algunos de ellos, es de suma importancia su estudio y persistencia de aquellos compuestos que perjudican el ambiente, teniendo como fin conocer el problema clave para emplear algunos medios que reducen su estancia en el suelo (Stevenson, 1972).

1.3 Persistencia de plaguicidas en el suelo

Se refiere al tiempo que permanecen algunos plaguicidas en el suelo manteniendo su actividad biológica. Su velocidad de descomposición puede durar menos de un día a varios años. Esto es determinado por la estructura química propia del ingrediente activo del plaguicida, pero también se debe a las condiciones ambientales que se encuentra en el suelo, intensidad de los rayos solares, temperatura del ambiente, grado de humedad, organismos presentes, etc.

1.4 Producción de metabolitos tóxicos.

Generalmente los plaguicidas pueden descomponerse en compuestos mucho más simples, sin embargo, los productos de degradación de algunos plaguicidas no son siempre inocuos, por ejemplo, ditiocarbamatos y fenilaminas producen metabolitos que son altamente tóxicos (Yáñez, 2010).

1.5 Influencia de los plaguicidas en la microflora del suelo.

Los plaguicidas no solo actúan sobre las plagas, sino que podrían afectar a otros microorganismos. El efecto puede ser la esterilización parcial del suelo, que tarda meses o años en recobrar el nivel de equilibrio en las poblaciones de microorganismos. Muchas veces incluso, puede producirse la proliferación de plagas por la eliminación de sus competidores naturales (Yáñez, 2010).

1.6 Incidencia de los plaguicidas en el suelo.

Las repercusiones sobre las propiedades físico-químicas del suelo pueden ser importantes, bien sea por la acción sobre la micro flora del suelo y con efectos a largo plazo por las dosis normales de la aplicación de los plaguicidas (Yanez, 2010).

1.7 Riesgos para la agricultura.

La aplicación de plaguicidas sobre los cultivos para tratar de combatir los agentes causantes de plagas y enfermedades puede entrañar un peligro potencial para la agricultura (Ortiz 2004).

1.8 Riesgos para el medio ambiente.

El empleo masivo y descontrolado de los plaguicidas químicos pone en riesgo al medio ambiente porque dichos productos pueden incorporarse en los eslabones de las cadenas alimentarias y alterarlas, lo que puede ocasionar graves modificaciones en los ecosistemas naturales. Los riesgos para el medio ambiente derivados del uso de plaguicidas afectando de manera general al suelo, a las aguas subterráneas y superficiales y sobre todo a la fauna (Ortiz 2004).

1.9 Contaminación de suelos agrícolas por metales pesados.

El suelo puede alcanzar un equilibrio después de un largo periodo de meteorización y bajas condiciones climáticas estables. Pero cuando uno de los parámetros varia, dicho equilibrio se rompe. Esto se debe a la interacción del hombre que es un componente singular de la biosfera, también este equilibrio se rompe debido a la inadecuada actividad de la agricultura, industria, minería, ganadería, etc. Este tipo de modificación negativa en el suelo se denomina normalmente degradación.

La presencia en los suelos de algunas concentraciones nocivas de elementos químicos y compuestos (contaminantes) es un tipo especial de degradación que se denomina contaminación. El contaminante siempre se encuentra en concentraciones mayores a las normales y por lo cual tiende a causar un adverso efecto sobre varios organismos.

Los primeros contaminantes suelen aparecer de la propia roca madre en la que se formó el suelo, de la actividad volcánica o del lixiviado de algunas mineralizaciones que se dan en el suelo. Al contrario, los antropogénicos suelen producirse por algunos residuos peligrosos derivados de algunas industrias agrícolas y mineras. Desde el punto de vista legal algunos contaminantes antropogénicos son los verdaderos contaminantes (Nacional Research Council, 2001; Brantley et.al. 2007).

La toxicidad de un elemento o algún compuesto químico se debe a algún material que afecta adversamente alguna función biológica. Los metales o compuestos tóxicos no tienen un origen biológico, excepto el caso particular de algunas toxinas que son compuestos tóxicos piogénicos.

Los contaminantes pueden abandonar el suelo por un proceso de volatilización, disolución, lixiviado o erosión y pasando a algunos organismos cuando estos pueden ser asimilables (bioasimilables), lo que normalmente ocurre cuando se encuentran en una forma más o menos

soluble. En concreto la posibilidad de que un elemento (contaminante o no) quede libre y pase a disolución en un suelo se llama disponibilidad.

La biodisponibilidad es un grado de libertad en el que se encuentra un elemento o un compuesto de alguna fuente potencial para ser este capturado por organismos ya sea ingerido o absorbido (Newman & Jagoe, 1994). Solo una pequeña fracción de la sustancia que es potencialmente contaminante de un medio es biodisponible. Por lo que su efecto puede ser muy negativo, pero también puede ser un poco indiferente para cualquier organismo que sea específico.

La biodisponibilidad de un elemento se debe a la función de:

- a. La forma física y química en la que se encuentra en el medio.
- b. La capacidad de los organismos para absorberlo o ingerirlo. Estos elementos pueden ser acumulados en el organismo (bioacumulación) hasta tres, cuatro o cinco órdenes de magnitud mayores que la concentración del medio donde vive.

1.10 Plomo

El plomo es un metal pesado de color plateado con tono azulado que se empaña para adquirir un color gris mate, tiene un peso atómico de 207,2 (g/mol) y número atómico de 82. Es flexible, inelástico, melástico y se funde con facilidad. Es relativamente resistente al ataque de ácido sulfúrico y ácido clorhídrico, aunque se devuelve con lentitud en ácido nítrico, tiene la capacidad de formar muchas sales, óxidos y compuestos organometálicos.

El plomo es un metal que existe naturalmente en la corteza terrestre. El nombre lo ha portado o llevado desde la era antigua, debido a su abundancia y la capacidad de fundirse con facilidad a conducido a que se haya esparcido con facilidad a través del medio (Militza, 2017).

1.11 Cadmio

El elemento químico de símbolo Cd, con número atómico 48 y peso atómico de 112.40 (g/mol) tienen una relación estrecha con el zinc, con el que se encuentra asociado en la naturaleza. Es un metal dúctil, de color blanco argentino con un ligero matiz azulado, cuenta con una densidad relativa de 8.65 a 20°C, su punto de fusión es 320.9°C y de ebullición de 765°C. Una cierta cantidad de éste es liberada en los ríos a través de una descomposición que sufren las rocas y también una cierta cantidad de este es liberado al aire a través de incendios forestales y por algunas erupciones volcánicas. El resto de este metal es liberado por las actividades que realizan los seres humanos, tales como suele ser la manufacturación.

Una importante fuente de emisión de cadmio se debe a la producción de algunos fertilizantes fosfatados artificiales, ya que una gran parte de éste termina en el suelo una vez que el fertilizante es aplicado en el mismo, este suele ser transportado a grandes distancias cuando es absorbido por el lodo y suele contaminar con mayor facilidad el suelo y las aguas superficiales (Lenntech BV 2017).

1.12 Metales pesados y elementos traza.

La mayoría de contaminantes inorgánicos son metales pesados. A veces la contaminación del suelo se produce también por las altas concentraciones. Los elementos traza más abundantes en los suelos pueden clasificarse en varias categorías de acuerdo a su forma química en la que se encuentran en las soluciones del suelo, entre ellos están los cationes (Ag^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cr^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+}).

Estas categorías no se incluyen mutuamente, porque algunos elementos pueden aparecer con más de una forma. Normalmente, Cr, Ni, Pb, y Zn varían entre 1-500 mg Kg^{-1} , Co, Cu y As entre 0.1 y 250 mg Kg^{-1} , y con menores proporciones Cd y Hg (0.01- 2 mg Kg^{-1}) (Brown, 1979).

Tabla 1-1. Concentraciones geoquímicas normales y anómalas en suelos

Elemento	Rango normal (ppm)	Concentraciones anómalas (ppm)
As	< 5-40	Hasta 250
Cd	< 1-2	Hasta 30
Cu	60	Hasta 2000
Mo	<1-5	10-100
Ni	2-100	Hasta 8000
Pb	10-150	10000 o más
Se	<1-2	Hasta 500
Zn	25-200	10000 o más

Fuente: (Bowie y Thomton 1985).

De todos los elementos traza encontrados en algunos suelos, hay 17 que se consideran como muy tóxicos y a la vez fácilmente disponibles en varios suelos en concentraciones que sobrepasan los niveles de toxicidad. Estos son: Ag, As, Bi, Cd, Co, Cu, Hg, Ni, Pb, Pd, Pt, Sb, Se, Sn, Te, Tl y Zn. De ellos, 10 son fácilmente movilizados debido a la actividad humana y en proporciones

que exceden en una alta medida los procesos geológicos. Este es el caso de: Ag, As, Cd, Cu, Hg, Ni, Pb, Sb, Sn, y Tl (Novotny 1995).

La EPA (US Environmental Protection Agency) incluye en la lista de contaminantes prioritarios traza: antimonio, arsénico, berilio, cadmio, cromo, cobre, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y zinc, introduciendo al berilio, respecto a las listas anteriores de los más tóxicos y disponibles.

1.13 Poder depurador de los suelos.

El suelo actúa como una barrera protectora de otros medios más sensibles (hidrológicos y biológicos) como;

- Filtrando
- Descomponiendo
- Neutralizando
- Almacenando contaminantes.
- Evitando en gran parte su biodisponibilidad.

Dicha capacidad depuradora de un suelo depende de algunos contenidos en la materia orgánica, carbonatos, oxihidroxidos de hierro y manganeso, de una proporción y tipo de minerales de la arcilla, de la capacidad de cambio catiónico del suelo, del pH, textura, permeabilidad y por supuesto la actividad microbiana del suelo.

Por tanto, para cada situación el poder depurador del suelo tiene un cierto límite. Cuando se superan esos límites para una o varias sustancias, el suelo funciona como un contaminante y relativamente proviene de una fuente contaminante (Cheng, et, al, 2001).

El poder amortiguador que existe en el suelo representa cierta capacidad que tiene el suelo para controlar algunos efectos negativos de los contaminantes, volviéndoles, así inocuos o inactivos. Para la mayoría de suelos agrícolas se ha definido de gran importancia la capacidad de carga para metales pesados. (LCASHM: LoadCapacity of Agricultural Soils for HeavyMetals) (Cheng, et, al, 2001), que depende de las propiedades del suelo, el tipo e historia de la contaminación derivada del suelo, de los organismos indicadores de la toxicidad, y de otros parámetros ambientales.

Los efectos amortiguadores de los suelos se llevan a cabo por:

- Neutralización

- Degradación biótica o abiótica
- Precipitación- disolución
- Oxidación- reducción
- Formación de complejos orgánicos o insolubilización.

La cantidad máxima admisible de un contaminante esta biodisponible en algunas cantidades que suelen ser toxicas tomando como nombre carga crítica y por lo que marca el umbral de toxicidad.

1.14 Contaminación de los suelos por elementos traza.

Los contaminantes en suelos y sedimentos se pueden hallar en seis formas diferentes (Rulkens ,et, al, 1995): como películas liquidas, adsorbidos, absorbidos, disueltos en el agua intersticial de los poros, o como fases solidas en los poros.



Figura 1-1. Estado físico de contaminantes en suelos y sedimentos
Fuente: (Rulkens et al, 1995).

De acuerdo a cada caso los comportamientos del contaminante son distintos. Por ello, el análisis químico en los elementos traza de un suelo es una medida muy poco representativa de la peligrosidad de ciertos contaminantes. Indica en estos casos cierta peligrosidad potencial y futura, pero nunca la actual de los elementos que se determinan, siempre cuentan con una cierta

referencia a ciertos valores acordados previamente que no pueden ser superados de ninguna manera.

Debido a ello además de estos análisis realizados es necesario disponer de algunos datos sobre cómo se encuentran estos elementos potencialmente tóxicos, tanto en las formas físicas como en las químicas, y las fracciones asimilables, que es una medida directa de la peligrosidad real. De otra forma, la facilidad con la que un metal potencialmente tóxico puede acceder a la cadena alimenticia depende de si el metal está ligado a las partículas de suelo y su forma química.

1.15 La movilidad de los contaminantes y los parámetros geográficos.

La movilidad de un metal no solo depende de una especificación química, sino de algunos parámetros del suelo tales como:

- pH
- Materia orgánica
- Carbonatos
- Minerales de la arcilla

No todos los cationes de cambio están igualmente disponibles, sino que depende del mineral o los minerales que están formando parte de un complejo de cambio. Cuando el metal está precipitado, no se comporta igual si este lo hace como carbonato, sulfato o fosfato. Tampoco será lo mismo que el metal se encuentre formando parte de un sulfuro (relativamente oxidable y solubilizable) que de un silicato (prácticamente es resistente en todos los medios).

Por lo general cierta movilidad de ciertos contaminantes es muy baja, porque se quedan acumulados en los próximos centímetros del suelo, siendo como lixiviados a los horizontes que son inferiores, pero en muy pequeñas cantidades. Por ello la presencia de sus altas concentraciones en los horizontes superiores decrece drásticamente en profundidad cuando la contaminación es antrópica. Esto es debido a que la disponibilidad de un elemento depende fundamentalmente de las características del suelo y por ende en donde se encuentra el mismo.

Los parámetros geográficos son esenciales para valorar la estabilidad de los suelos ante a la agresión de dichos contaminantes:

- a) pH. – La mayoría de los metales tienden a estar mucho más disponibles a un pH ácido porque son menos fuertemente adsorbidos, excepto As, Mo, Se, y Cr, que son mucho más móviles ante un pH alcalino.
- b) Textura. – Los suelos arcillosos tienden a retener más metales por adsorción o en el complejo de cambio de ciertos minerales de la arcilla. Por el contrario, los arenosos carecen de la capacidad de fijación y estos pueden contaminarse en el nivel freático.
- c) Mineralogía de arcillas. – Cada mineral de la arcilla tiene unos determinados valores de superficie eléctrica y de descompensación eléctrica. Cuanto mayor es la superficie activa de un filosilicato, mayores son sus posibilidades de adsorber metales pesados.

Tabla 2-1: Área superficial típica de minerales del suelo

Minerales del suelo	Área superficial (m ² /g)
Caolinita	7-30
Illita	65-100
Montmorillonita	700-800
Óxidos de manganeso	30-300
Geothita	40-80
Carbonatos/ arenas	0,55-5

Fuente: (Bourg, 1995).

Este poder de adsorción será máximo en el punto de carga cero superficial, cuando su competencia con los H⁺ es mínimo, lo que se consigue a diferentes pH según el mineral (Sposito, 1989).

Sin embargo, la importancia de los minerales de la arcilla como adsorbente es secundaria cuando en un suelo existe abundante materia orgánica y/o oxihidroxidos de hierro, componentes más competitivos (Galán, 2000).

Tabla 3-1. Punto cero de carga (PZC) superficial.

Mineral	pH
Cuarzo/Sílice	2-3
Caolinita	4,0-4,5
Geothita	7,0-8,0
Hematites	8,0-8,5
Gibbsita	9,0-9,5
Humus	4,0-4,5

Fuente: (Sposito, 1989)

- a) **Materia orgánica.** – Reacciona con los metales formando complejos de cambio o quelatos. La adsorción puede ser tan fuerte que queden estabilizados, como el caso del Cu, o forman quelatos también muy estables, como puede pasar con el Pb y Zn.
- b) **Capacidad de cambio.** –La capacidad de intercambio catiónico que depende netamente de los tipos de minerales de la arcilla, materia orgánica, valencia y radio iónico hidratado de los metales. Es decir, a mayor tamaño y menor valencia frecuentemente quedan retenidos. Con respecto a algunos minerales de la arcilla, dicha retención es mínima para algunos minerales del grupo caolín.
- d) **Condiciones redox.** – El potencial de oxidación-reducción es el responsable de que dicho metal este en estado oxidado y reducido.
- e) **Carbonatos.** – Se debe a la presencia de los carbonatos quienes garantizan el mantenimiento de los valores altos de PH, y debido a estas condiciones tienden a precipitarse los metales que son pesados. Tal es el caso del Cd que este puede quedar adsorbido por los carbonatos existentes en el suelo.
- f) **Óxidos e hidróxidos de Fe y Mn.** – Estos juegan un papel muy importante en la retención de algunos metales pesados y también en su inmovilización. Porque son encontrados fácilmente diseminados en la superficie del suelo y por lo que son demasiado activos. Por su baja cristalinidad y por su pequeño tamaño de partícula, estos tienden a tener una muy alta capacidad sorcitiva para los metales que son divalentes, entre ellos están el Cu y Pb, en su menor extensión el Zn, Co, Cr, Mo, Ni, y también el As.
- g) **Salinidad.** – Debido a un aumento de la salinidad se puede incrementar la movilidad de los metales y su retención por dos mecanismos importantes que son los cationes Na Y k que pueden reemplazar a los metales pesados en algunos lugares en que se da el intercambio

catiónico. La segunda fase, son los aniones tales como el cloruro y el sulfato que pueden formar compuestos mucho más estables con algunos metales tales como Pb, Zn, Cu, Cd, y Hg. Se toma en cuenta que estas sales normalmente dan al suelo un PH alcalino (Galán et, al,2008).

1.16 Biorremediación.

Un suelo agrícola se considera contaminado cuando existe una concentración que sobrepase los limite permisibles de metales pesados tales como el cadmio que sobrepase los 0,5 mg/Kg y el plomo que sobrepase los 25 mg/Kg de concentración en un suelo, por lo que este puede presentar algunas alteraciones en sus propiedades físicas, propiedades químicas y biológicas.

Existen algunas consecuencias causadas al ambiente por contaminación de metales pesados en el suelo, por lo que estos metales pesados impiden una producción agrícola alta en el mismo.

Este tipo de metales pesados puede causar cambios en la temperatura, humedad, textura del suelo, porosidad, intercambio catiónico, fertilidad del suelo y una alta cantidad de ellos pueden ser procesos lentos que ocasionan una mayor toxicidad no solo al suelo sino también a las plantas, además ocasiona una alta salinidad en el suelo, lo que en algunos casos esta dificulta un tratamiento difícil para este suelo, ocasionando problemas en la estructura terciaria de algunas proteínas, desnaturalización de enzimas, deshidratación de células vegetales.

Por lo cual este es uno de los muchos casos letales para algunos microorganismos usados para el tratamiento o biorremediación de un suelo agrícola contaminado con metales pesados.

La biorremediación es una alternativa donde se utilizan organismos biológicos que puede realizarse in situ, y ex situ y por lo cual esta involucra el uso de microorganismos eficientes que degradan contaminantes orgánicos del suelo (Garbisu et, al, 2002).

Algunos microorganismos alteran o destruyen algunas moléculas de metales pesados en diversos metabolitos, estos incluso pueden derivarlos en iones, minerales y agua que son compuestos inocuos para el ambiente.

Algunas bacterias y hongos son los principales involucrados en la oxidación de por lo tanto en la mineralización de algunos metales pesados.

Las prácticas de biorremediación consiste en el uso adecuado de microorganismos tales como son las plantas, hongos, bacterias naturales o modificadas genéticamente cuyo papel es neutralizar

algunas sustancias tóxicas y transformarlas en sustancias menos tóxicas o inocuas para luego ser liberadas al medio.

La biorremediación puede dividirse de acuerdo a dicho organismo que efectuó la degradación de un compuesto xenobiótico.

La fitorremediación se basa en la utilización de plantas para remover algún contaminante existente en el suelo e incluso en aguas, por lo que es una técnica muy apropiada para la remoción de metales pesados.

La biorremediación de un suelo se puede realizar in situ y ex situ que corresponde a una biorremediación referente a varios tratamientos que estos no requieren excavación profunda del suelo contaminado; ex situ es aquel método donde la excavación del suelo o material a tratar se lo maneja por medio de un sistema controlado como puede ser una celda de landfarming o algún tipo de birreactor (Vullo 2003).

Las técnicas in situ tienen una mayor ventaja sobre las ex situ debido a que implica un menor costo y también porque disminuye la generación de residuos que se eliminan en la superficie del suelo.

La técnica de biorremediación ex situ es la que mayor se aplica por lo que esta utiliza microorganismos autóctonos que en el suelo aquellos degradan un número muy significativo de constituyentes de lodo, pero la eficacia y población de estos se ven afectados debido a la función de los contaminantes.

La biorremediación es la tecnología que controla contaminantes utilizando sistemas biológicos que catalizan la degradación y transformación de algunos compuestos que son tóxicos y los transforma a compuestos menos dañinos.

Uno de los objetivos más importantes de la biorremediación es tratar de aumentar y mejorar la biodegradación por aquellos organismos nativos (microflora), a esto se conoce como biorremediación intrínseca, o también se realiza por medio de la acción de organismos conocido como bioaumentación.

1.16.1 Métodos de biorremediación.

Los métodos empleados en la biorremediación son:

- 1.- Biofiltración: El aire contaminado pasa a biorreactores donde la flora microbiana degrada contaminantes volátiles en dióxido de carbono, agua y biomasa.
- 2.- Bioventing: es aquel proceso de biorremediación in situ que consiste en la ventilación forzada del suelo mediante la inyección de O₂ en la zona no saturada mediante pozos de inyección, la aireación favorece la degradación de los hidrocarburos por volatilización y migración de la fase más volátil del contaminante y por biodegradación, ya que al incrementar la oxigenación del suelo se estimula la actividad microbiana.
- 3.- Biospargin: Método in situ que combina el efecto de la ventilación con la utilización de microorganismos autóctonos para degradar compuestos orgánicos absorbidos por el suelo en la zona saturada para mejorar la actividad de microorganismos presentes.
- 4.- Biopilas: Método de biorremediación ex situ en condiciones no saturadas se fundamenta en la reducción de la concentración de contaminantes derivados del petróleo de suelos excavados mediante el uso de la biodegradación. La técnica consiste en la formación de pilas y material biodegradable de dimensiones variables formadas por suelos contaminados y materia orgánica, compost, en esta se aplica una aireación activa volteando la pila, o pasiva por tubos de aireación.
- 5.- Atenuación natural: Técnica de borre mediación in situ de bajo costo, su característica principal es la utilización de procesos físico-químicos de interacción contaminante-suelo donde los procesos ocurren de forma natural, se conocen también como procesos de biotransformación natural (Alegría 2013).

1.17 Aplicaciones de hongos en tratamientos de biodescontaminación.

Aunque una buena parte de los estudios de descontaminación biológica se han centrado en bacterias por la facilidad que ofrecen sus vías metabólicas y llevar a cabo construcciones genéticas que permitan degradar específicamente determinados contaminantes, la capacidad de los hongos para transformar una gran variedad de compuestos orgánicos hasta CO₂ Y H₂O ofrece un potencial indiscutible para su utilización en procesos de tratamiento de contaminaciones.

Este potencial radica precisamente en aquellas características de un sistema enzimático y en adecuado desarrollo que permite su rápido desarrollo del micelio, colonizando varios tipos de sustrato, accediendo a algunos compuestos que constituyen las contaminaciones más frecuentes en el suelo.

El valor alto de una relación superficie/volumen celular de los hongos filamentosos los convierte en degradadores muy eficaces en determinados nichos como los suelos contaminados.

Los hongos tienen la capacidad muy notable de acumular metales pesados, tales como son el cadmio, cobre, mercurio, plomo y zinc.

Las ventajas que tienen los hongos son varias, estas facilitan los usos en biorremediación, un ejemplo claro es que los hongos en la mayoría de los casos se encuentran presentes en algunos sedimentos acuáticos y en hábitats terrestres, además tienen algunas ventajas sobre algunas bacterias por el simple hecho de que sus hifas tienen la capacidad de penetrar un suelo contaminado, produciendo enzimas extracelulares que las mismas son encargadas de degradar los contaminantes del suelo.

Este tipo de hongos blancos de putrefacción han demostrado que tienen la capacidad de atacar un amplio espectro de metales pesados (Martin et. al, 2004).

1.18 Hongos ligninolíticos y compuestos xenobióticos.

Este tipo de hongos ligninolíticos desarrollan un sistema enzimático único que no es específico, pero funciona en un ambiente extracelular. Es un mecanismo del sistema degradador de lignina, basándose en la producción de radicales libres.

Este mecanismo permite que dichas enzimas estén catalíticamente activas sobre una gran variedad de sustratos orgánicos. La diversidad grande y estructural de algunos contaminantes son degradados por este tipo de hongos, por el cual se les confiere un alto grado de biorremediación.

Este tipo de hongos son excelentes degradadores de muchas diversidades de contaminantes peligrosos en el ambiente (Dávila 2001).

1.19 Lacasa.

Las lacasas son fenoloxidasas ampliamente distribuidas en las plantas, hongos de diferentes clases (Gianfreda et. al, 1999) y algunas bacterias.

La función de las lacasas en los hongos no está muy clara, debido a que se ha relacionado con la morfogénesis, con la pigmentación de los conidios, con una formación de rizomorfos, con un desarrollo de cuerpos fructificantes con la patogénesis, y en la protección frente a algunos compuestos fenólicos tóxicos liberados durante la degradación de la lignina (Bollag et. al, 1988).

1.19.1 Importancia de los hongos en la naturaleza.

Los hongos de la podredumbre blanca sobreviven de la descomposición de la materia orgánica en varias formas, estos incluyen basura, hojarasca y varios sustratos que se incluyen para su degradación, son capaces de reincorporar algunos materiales orgánicos que se perdieron en el suelo, por ende, su papel fundamental es la formación y recuperación de los suelos.

Los hongos basidiomicetos son los causantes de la podredumbre blanca, es decir son excelentes degradadores de lignina, esta especie de hongos tienen las características adecuadas que se utilizan en varios procesos biotecnológicos en estos se incluyen los procesos de biodescontaminación.

El hongo *Pleurotus ostreatus* pertenece al tipo de hongo comestible, tiene un valor nutricional demasiado alto, y lo más importante es que tiene una amplia apertura en la industria alimenticia (Cohen et, al, 2002).

1.19.2 Descripción botánica del hongo Pleurotus ostreatus.

Es muy necesario que el hongo que se cultiva sea identificado correctamente desde un punto de vista taxonómico, ya que de esto depende las técnicas que se van a utilizar en el respectivo cultivo.

Nombre científico: *Pleurotus ostreatus* var. Florida

Nombres comunes: setas, hongo, orejas blancas, orejas de palo, orejas de patacas, orejas de cazahuate, orejas de izote.

Sistemática: La identificación de las distintas especies de hongos es necesaria para decidir si son o no apropiados para el consumo (Ramos 2007).

REINO: Fungi

SUBREINO: Fungi Superior

CLASE: Basidiomycetos

ORDEN: Agaricales

FAMILIA: Pleurotuaceae

GÉNERO: *Pleurotus*

ESPECIE: *Ostreatus*

VARIEDAD: Florida



Figura. 2-1: Hongo *Pleurotus ostreatus*
Realizado por: Enitt Lemache



Figura 3-1. Crecimiento de *Pleurotus ostreatus*.
Realizado por: Enitt Lemache

1.19.3 Características del Pleurotus sp.

Una muy buena producción del *Pleurotus Ostreatus* se basa en la utilización de algunos residuos que son fácilmente degradados por este hongo, este a la vez requiere la presencia de ciertos microorganismos apropiados, estos pueden ser ciertas comunidades microbianas complejas.

Para que esto se dé, el ambiente tiene que estar apto para el crecimiento de ciertos microorganismos, así como para la producción de algunas reacciones químicas de transformación en velocidades significativas.

Se debe tomar en cuenta varios factores que en realidad son demasiado importantes en los que se nombran algunos, tales como: características del sustrato a utilizar, la concentración de los nutrientes, temperatura, pH, humedad, entre otros (Ramos 2007).

Algunas ventajas de cultivar *Pleurotus*.

- Agentes biológicos que son capaces de transformar la materia orgánica no comestible y de bajo valor económico en productos importantes con un valor agregado muy alto.
- Se pueden cultivar en algunos sustratos que no están fermentados previamente.
- Suele fructificarse perfectamente en los residuos que tienen un bajo contenido de nitrógeno, produciendo frutos con un alto contenido del mismo elemento.

- Tienen la capacidad de tolerar altas concentraciones de CO₂ en la atmósfera ambiental.
- Su cosecha fructífera es demasiado sencilla.

1.19.4 Generalidades sobre el cultivo

Los cultivos de estas setas se realizan por medio de diferentes técnicas, pero lo fundamental en ellas consiste en la siembra del micelio en un sustrato húmedo (casi siempre pasteurizado), este debe ser incubado a 20-25° C, por lo tanto, este debe ser cubierto con plástico y por ultimo este cultivo debe ser mantenido en unos sitios que sea muy húmedos y frescos, generalmente a unos menos de 15° C, hasta que las setas salgan.

1.19.5 Siembra o incubación

Consiste en hacer una mezcla del micelio con el sustrato ya preparado, hasta que quede uniforme. La cantidad del micelio debe variar entre 1 y 4 % de peso húmedo. A una mayor cantidad el desarrollo del hongo será más rápido y abundante pero la temperatura también será mayor, lo que perjudicará al desarrollo del micelio.

Este micelio se debe preparar correctamente en el laboratorio, donde se germinan las esporas en unas placas con agar PDA. Luego se procede a hacerlos crecer en algunos granos de trigo esterilizados para su mayor eficiencia de propagación del micelio, ya una vez que estos estén bien colonizados se procede a realizar la incubación en un ambiente cerrado para evitar cualquier contaminación o deshidratación del mismo, manteniendo también una humedad adecuada del 85%.

En esta etapa puede variar su duración, pero por lo general ya en las cuatro semanas el micelio cubre toda la caja Petri, tomándose el sustrato completamente de un color blanco, por lo que luego empiezan a aparecer unos puntos diminutos y grandes cantidades, a estos se los llama primordios, estos son las primeras manifestaciones de los cuerpos fructíferos de las setas de los hongos, estos indican que es el debido momento para que sean llevados a ser fructificadas (Ramos 2007).

1.19.6 Fructificación

Una vez que el sustrato se invade por el micelio del hongo, se debe cambiar las condiciones del cultivo, proporcionándoles un ambiente adecuado para lograr una excelente producción.

En este punto se debe aumentar la humedad relativa, por lo cual debe ser un ambiente cerrado libre de contaminación, evitando así una deshidratación y manteniendo la humedad por encima del 90 %.

En este periodo de fructificaciones se deben mantener temperaturas máximas de 20°C a 22°C, con una humedad relativa de un 90 % al 100 %.

1.19.7 Condiciones ambientales para el crecimiento de los hongos.

Existen ciertas condiciones que son óptimas para el crecimiento de hongos, esto se debe a algunos factores físicos y químicos, tales como pueden ser: temperatura, pH, etc. Sin embargo, existen otros tipos de condiciones ambientales que son extremas, tales como una escasez de nutrientes esenciales (Hernández 2003).

1.19.7.1 Temperatura

La mayoría de los hongos son mesófilos, crecen a temperaturas moderadas en un intervalo de 10 a 40°C. Para fines prácticos, la mayoría de los hongos crecen muy bien a temperaturas ambiente. Mientras que las temperaturas de 30 a 37°C, que por lo común son idóneas para las bacterias, son inadecuadas para muchos hongos.

Pocos hongos son termófilos y crecen en el intervalo de 20 a 50°C, con una temperatura optima de (o cerca de) 40°C y un límite máximo de 60-62° C.

1.19.7.2 Concentración de iones hidrógeno

Las respuestas de los hongos al pH son en gran medida por otros factores no relacionados, sin embargo, en el laboratorio muchos hongos crecen en un intervalo de pH de 4,5 a 8,0, y muestran un amplio intervalo de pH óptimo de 5,5 a 7,5.

Una muy buena parte de la información existente acerca del pH se dice que proviene de muchos estudios anteriores sobre las enzimas de los hongos, con un pH óptimo entre 5,0 y 5,5.

Algunos otros factores se ven afectados por el pH, a estos se incluye la permeabilidad de la membrana y el grado de disociación de las moléculas en iones. Por ende, es muy posible que el hongo sea incapaz de absorber nutrientes esenciales a un cierto valor de pH, o bien encuentre niveles tóxicos de algunos compuestos, dependiendo del grado de toxicidad en la forma disociadas o en la no disociada.

Los hongos a menudo alteran su pH en el medio que crecen y lo hacen por:

- Absorción selectiva e intercambio de iones.
- Producción de CO₂ o NH₃,
- Producción de ácidos orgánicos,

En cuanto al crecimiento a niveles extremos de pH, hay muchos hongos que son acidófilos o tolerantes al ácido, pero sólo hay unos cuantos verdaderamente basófilos.

1.19.7.3 Aireación

La mayoría de los hongos son aerobios estrictos; requieren oxígeno por lo menos en pequeñas cantidades para su crecimiento.

1.19.7.4 Humedad

Hay maneras de definir la disponibilidad de agua para un organismo. Esto es la humedad relativa (HR) en equilibrio, en cuyo caso el 70 % de HR es, para fines prácticos, el límite inferior para el crecimiento del hongo, aunque algunos crecen con mucha lentitud a una HR menor de 65 %. Los hongos muestran un comportamiento muy variado con respecto a la disponibilidad de agua, pero en general son mucho más tolerantes a la escasez de agua que otros organismos.

1.19.7.5 Luz

La parte viable del espectro (longitudes de onda entre 380 y 729 nm.) tiene efecto, hasta donde se sabe, en el crecimiento vegetativo de los hongos, aunque puede tener efectos importantes en la esporulación.

La radiación ultravioleta en la región de 200 – 300 nm tiene efectos mucho más pronunciados en el crecimiento vegetativo. Esta radiación produce mutaciones y daño letal, afectando el DNA.

A diferencia del crecimiento vegetativo, el desarrollo de las estructuras reproductoras sexuales y asexuales es a menudo afectado por la luz.

Tabla 4-1: Rango óptimo de los principales factores que afectan el crecimiento de las especies del genero *Pleurotus*.

PARÁMETRO	RANGO
Temperatura	20 – 26°C
Humedad Relativa	85 – 90 %
Humedad del sustrato	50 – 60 %
Luz	Suficiente para leer, al menos durante una hora diaria
Renovación del aire	6 veces el volumen de la sala por hora

Fuente: Ramos 2007

Realizado por: Enitt Lemache

CAPITULO II

2. METODOLOGÍA

2.1 Tipo de investigación

La presente investigación es de tipo aplicada a la Biotecnología Ambiental.

Diseño de la investigación:

- Diseño completo al azar con dos tratamientos y 3 réplicas para cada tratamiento en el laboratorio con un coeficiente de variación del 5%.
- Diseño experimental; en la presente investigación se manipulo el suelo con dos tipos de sustrato, cascara de cacao y tamo de cebada (factor) y mediante un respectivo análisis estadístico se obtuvo un índice de remoción de la concentración de Cd y Pb (variable respuesta).

Tamaño muestral:

En la investigación se tomaron 2 unidades experimentales

Diseño:

Completamente aleatorio

Nivel de investigación:

Descriptivo debido a que se puede evidenciar la variación de la concentración de plomo y cadmio por acción del sustrato cascara de cacao y tamo de cebada en el suelo.

Enfoque

- Mixto; debido a que se integraron los enfoques cualitativos como cuantitativos de la variable manipulada y de los datos obtenidos a través del diseño experimental.

2.2 Lugar de investigación

La presente investigación se realizó en los laboratorios de Agronomía y Biotecnología de las Facultades de Recursos Naturales y en la Facultad de Ciencias pertenecientes a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo de la Ciudad de Riobamba ubicada a 2756

m.s.n.m con una temperatura promedio de 17°C – 20°C, con una humedad relativa promedio de un 40 – 60% y con una presión atmosférica de 540 mm Hg.

Los análisis físico-químicos del suelo se realizaron en el laboratorio de Suelos de la Facultad de Recursos Naturales de la ESPOCH.

Las muestras del suelo fueron tomadas en la Zona el TIMBRE perteneciente al Cantón QUININDE provincia de ESMERALDAS.



Figura 1-2: Ubicación de la zona el Timbre del cantón Quinindé-Esmeraldas

Fuente: Google maps, 2017.

2.2.1 Lógica de la investigación

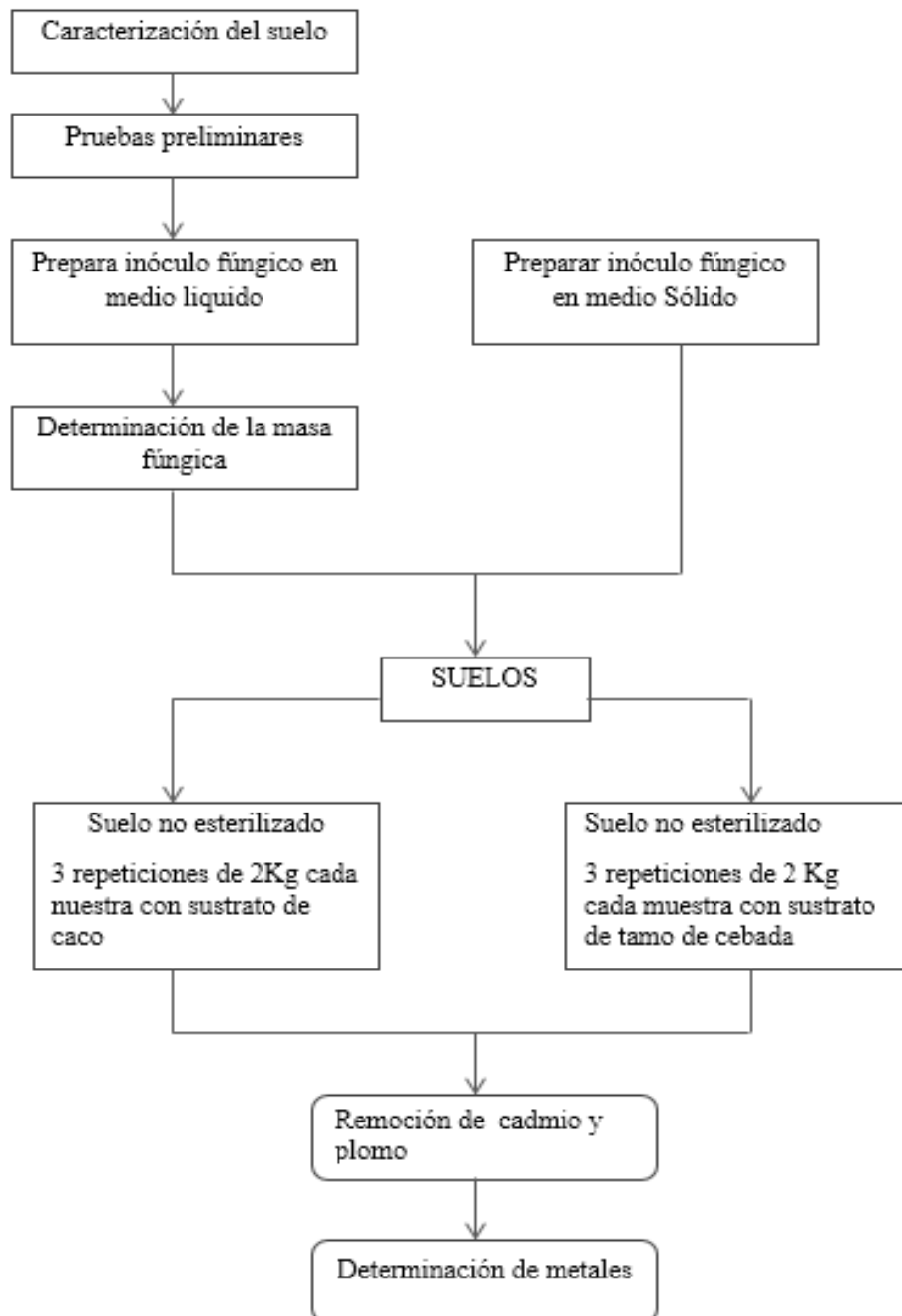


Figura 2-2. Procedimiento para la determinación de metales
Realizado por: *Enitt Lemache*.

2.2.2 Esquema de la investigación

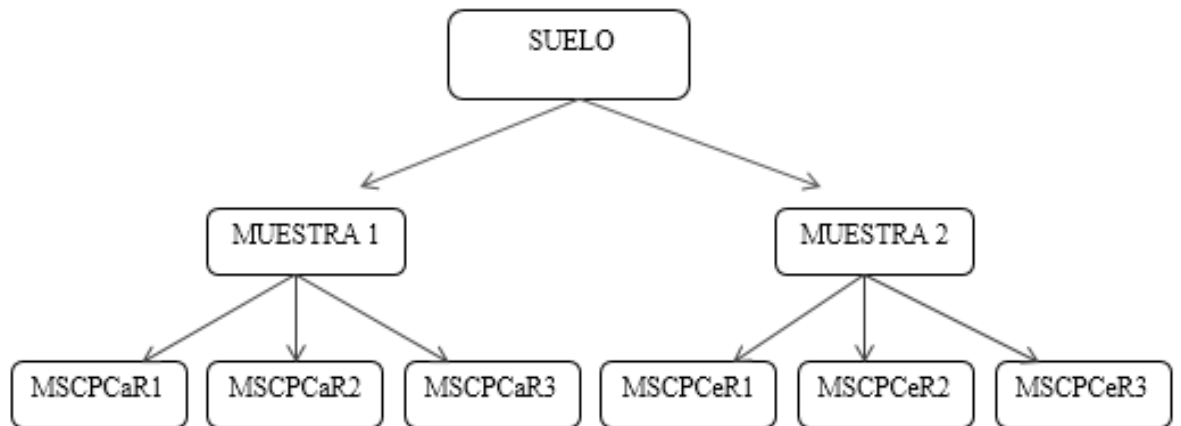


Figura 3-2: Esquema de la investigación

Realizado por: *Enitt Lemache*

MSCPCaR1: Muestra de suelo contaminado, *Pleurotus*, cacao, repetición uno.

MSCPCaR2: Muestra de suelo contaminado, *Pleurotus*, cacao, repetición dos.

MSCPCaR3: Muestra de suelo contaminado, *Pleurotus*, cacao, repetición tres.

MSCPCeR1: Muestra de suelo contaminado, *Pleurotus*, cebada, repetición uno.

MSCPCeR2: Muestra de suelo contaminado, *Pleurotus*, cebada, repetición dos.

MSCPCeR3: Muestra de suelo contaminado, *Pleurotus*, cebada, repetición tres.

2.2.3 Variables de control

Tabla 1-2. Variables de control

Variables Dependientes
Cd, Pb
Masa fúngica

Variables Independientes
Humedad
pH
Temperatura

2.3 Procedimiento

2.3.1 Reactivación de la Cepa *Pleurotus ostreatus*

Según dice (Aguilar 2007) estos hongos necesitan de ciertos nutrientes ricos en carbono, por esta razón se escogió el agar PDA debido a que este tiene un muy alto contenido de dextrosa (fuente de carbono).

Tabla 2-2: Reactivación de la Cepa *Pleurotus ostreatus*

MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS
Cajas Petri
Asa para inoculación
mechero de alcohol
Cepas de <i>P. ostreatus</i>
Balanza digital
Autoclave
Cámara de flujo laminar
Estufa de cultivo
agua destilada
agar PDA
Cloranfenicol (capsula)

Realizado por: Enitt Lemache, 2017.

Se preparó 200 ml de agar PDA y se esterilizo en la autoclave durante 20 minutos con una temperatura de 121°C, luego se dejó enfriar a una temperatura ambiente. Una vez enfriado el medio a 45°C se añadió una capsula de cloranfenicol, luego se procedió a regar el medio en las cajas Petri, siempre y cuando estas condiciones de trabajo sean asépticas para que no se contaminen. Posteriormente con un asa se inoculo el agar colocando el micelio hacia arriba del medio y por último se selló las cajas y se llevó a la incubadora a unos 28°C durante 8 días.

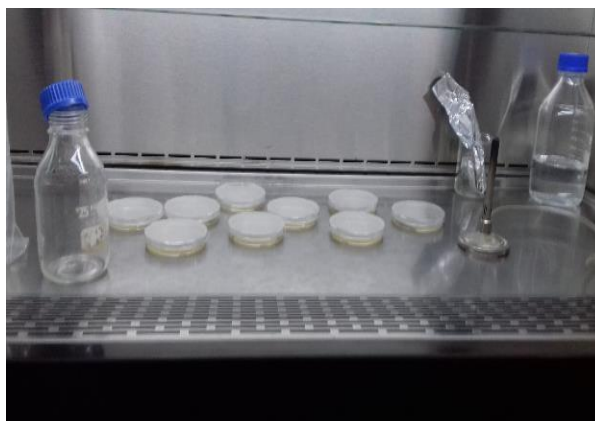


Figura 4-2: Reactivación de la Cepa *Pleurotus ostreatus*
Realizado por: Enitt Lemache, 2017.

2.3.2 Preparación de inóculos

Tabla 3-2: Preparación de inóculos

MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS
Recipiente pequeño de plástico
Vaso desechable
Frascos de vidrio con tapas
Espátula
Cepa de <i>P. ostreatus</i> var. Florida
Trigo perlado
Balanza digital
Cámara de flujo laminar
Mechero de alcohol
Estufa de cultivo
Agua destilada

Realizado por: Enitt Lemache, 2017.

Se recogió 3 kg de granos de trigo, retirando así todo tipo de impurezas, luego se removió en agua durante unos 10 minutos, esto se realizó para la remoción de basuras, luego se procedió a enjuagar otra vez con agua repitiendo el procedimiento más de dos veces para que este quede completamente limpio, continuando con el embazado de trigo en los recipientes de vidrio, ya que cada recipiente de vidrio contenía unos 150 gramos de trigo llevándolos a esterilizar en la autoclave durante unos 20 minutos y a una temperatura de 120°C.



Figura 5-2: Preparación de inóculos en semillas de trigo.
Realizado por: Enitt Lemache, 2017.

Siguiendo con el procedimiento, en la cámara de flujo laminar se preparó los inóculos cortando la cepa de *Pleurotus ostreatus* con una espátula en porciones sumamente pequeñas, las que luego estas serían colocadas en los recipientes vidrio. Luego varias proporciones de la cepa se pasaron a las botellas removiéndolas hasta que estas queden completamente distribuidas en todo el envase esterilizado, conservándose los envases a una temperatura que oscila entre los 25 – a 30°C hasta que el trigo este totalmente colonizado, esto se dio a una oscuridad total durante 4 semanas.



Figura 6-2: Preparación de los inóculos en las semillas de trigo.
Realizado por: Enitt Lemache, 2017.



Figura 7-2: Propagación del micelio en el sustrato de trigo.
Realizado por: Enitt Lemache, 2017.

2.3.3 Preparación del sustrato

Tabla 4-2: Preparación del sustrato

MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS
Cascara de cacao seca
Tamo de cebada
fundas de polietileno
agua destilada
recipiente grande de plástico
fundas de basura
Autoclave
balde grande
Balanza
Espátula

Realizado por: Enitt Lemache, 2017.

Se recolectaron aproximadamente 5kg de cascara de cacao y 5k de tamo de cebada, se procedió a triturar los sustratos, obteniendo así pequeños trozos aproximadamente de 5 milímetros cada uno, luego estos sustratos se lavaron con agua destilada, eliminando así todo tipo de impurezas, estos sustratos se dejaron en remojo durante 24 horas.



Figura 8-2: Preparación del sustrato, cascara de cacao y tamo de cebada.

Realizado por: Enitt Lemache, 2017.

Una vez ya remojados los sustratos se procedió a enfundar 1 kg de cada sustrato, para luego estos ser llevados a esterilizar en el autoclave a una temperatura de 120°C, para una mayor eficiencia del sustrato se realizó 3 esterilizaciones.



Figura 9-2: Sustratos de cacao y tamo de cebada en remojo,
Realizado por: Enitt Lemache, 2017.



Figura 10-2: Enfundado de los sustratos.
Realizado por: Enitt Lemache, 2017.

Ya esterilizados los sustratos, se los llevo a la cámara de flujo laminar para proceder a siembra de micelio en los sustratos de cacao y tamo de cebada, para que estos colonicen completamente, el tiempo que colonizo todo el sustrato es de 4 semanas ya quedando listos para proceder a utilizarlos en la remoción de metales en el suelo.



Figura 11-2: Propagación del micelio en el sustrato.
Realizado por: Enitt Lemache, 2017.

2.3.4 Toma de muestras y caracterización del suelo

En la toma de muestras para la caracterización del suelo se aplicó el procedimiento específico de ensayo PEE/LAB-CESTTA/02 Muestreo de suelos que el LAB-CESTTA utiliza en un sistema de calidad.



Figura 12-2: Toma de muestras y caracterización del suelo.
Realizado por: Enitt Lemache, 2017.

2.3.5. Muestreo en calicatas

Se realizaron las respectivas excavaciones relativamente para remover varias secciones del suelo en las cuales fue de gran importancia realizar análisis detallados de las caracterizaciones del mismo suelo, por lo cual se aplicó el muestreo por calicatas, debido a que estas excavaciones revelan el perfil del suelo.

- 1.- En primer lugar, antes de realizar la excavación se aseguró que el terreno se encuentre libre de cualquier tipo de tuberías, para una mayor facilidad de toma de muestras.
- 2.- Luego se procedió a abrir 12 calicatas de aproximadamente 30 cm de ancho y 30 cm de profundidad de muestreo seleccionada y limpia y por lo que es un suelo agrícola.
- 3.- Se utilizó una pala para quitar 3 a 4 cm del espesor de la pared vertical del suelo para tomar la respectiva muestra.
- 4.- Se tomaron muestras usando un muestreador adecuado de acuerdo a las necesidades de ensayo que se van a realizar.
- 5.- Para la toma de muestras usadas en el laboratorio se recogieron aproximadamente 50 Kg de suelo contaminado.

6.- Las muestras fueron seleccionadas de la zona menos productiva del sector. Estas fueron empacadas en fundas ziploc para ser trasladados al laboratorio de Biotecnología Ambiental de la ESPOCH.



Figura 13-2: Muestreo del suelo.
Realizado por: Enitt Lemache, 2017.



Figura 14-2: Muestreo de suelos por calicatas.
Realizado por: Enitt Lemache, 2017.

2.3.6 Preparación de las muestras de suelo

A las muestras de suelo se realizó una homogenización para que este quede todo uniforme y así poderla utilizar en la remoción de metales en el laboratorio. Por lo tanto, en este suelo no se realizó la correspondiente esterilización debido a que se va a realizar pruebas de biorremediación en el laboratorio, y por ende es una prueba para verificar si el hongo *P. Ostreatus* crece o no en este suelo contaminado, ya que en este actúa conjuntamente con la flora bacteriana nativa presente en las muestras de suelo.

2.3.7. Métodos

Tabla 5-2: Métodos para la determinación de los parámetros del suelo

PARÁMETRO	MÉTODO
Temperatura	Termómetro calibrado
Humedad	Hidrómetro
pH	Hidrómetro
Masa fúngica	Cultivo en agar selectivo, método gravimétrico
Metales pesados Cd, Pb	PEE/CESTTA/76 EPA SW-846 N 3050B, 7130 PEE/CESTTA/78 EPA SW-846 N 3050B, 7420

Realizado por: Enitt Lemache, 2017.

2.4 Preparación de las macetas de remoción de metales pesados

- ✓ Se utilizó macetas de plástico de 50 cm de largo y 25 cm de ancho.
- ✓ Se utilizó fundas de plástico transparente para forrar las macetas.
- ✓ Se armó 7 celdas para el tratamiento de remoción.
- ✓ Se etiquetó las celdas de acuerdo a cada tratamiento.



Figura 15-2: Preparación de las macetas de remoción.
Realizado por: Enitt Lemache, 2017.

2.4.1 Preparación de los tratamientos de remoción de metales

- Tratamiento 1, tres repeticiones (Suelo contaminado con cascara de cacao).

MSCPCaR1: se utilizó para este tratamiento 2 Kg de suelo contaminado y 0,25 kg de sustrato, cascara de cacao con *Pleurotus ostreatus*).

MSCPCaR2: se utilizó para este tratamiento 2 Kg de suelo contaminado y 0,25 kg de sustrato (cascara de cacao con *Pleurotus ostreatus*).

MSCPCaR3: se utilizó para este tratamiento 2 Kg de suelo contaminado y 0,25 kg de sustrato (cascara de cacao con *Pleurotus ostreatus*).



Figura 16-2: Preparación de los tratamientos de la remoción.
Realizado por: Enitt Lemache, 2017.

- Tratamiento 2, tres repeticiones (Suelo contaminado con tamo de cebada).

MSCPCeR1: se utilizó para este tratamiento 2 Kg de suelo contaminado y 0,25 kg de sustrato, tamo de cebada con *Pleurotus ostreatus*).

MSCPCeR2: se utilizó para este tratamiento 2 Kg de suelo contaminado y 0,25 kg de sustrato (tamo de cebada con *Pleurotus ostreatus*).

MSCPCeR3: se utilizó para este tratamiento 2 Kg de suelo contaminado y 0,25 kg de sustrato (tamo de cebada con *Pleurotus ostreatus*).



Figura 17-2: Preparación de los tratamientos de la remoción de metales.
Realizado por: Enitt Lemache, 2017.



Figura 18-2: Preparación de los tratamientos de la remoción de metales.
Realizado por: Enitt Lemache, 2017.

2.4.2. Control de parámetros en los tratamientos

Temperatura

El control de temperatura se registró pasando un día, ya que no variaba mucho, es decir se hacía las mediciones tres veces a la semana, lunes, miércoles y viernes, durante 6 semanas utilizando un termómetro calibrado.

pH

Este parámetro se midió pasando un día, es decir durante las 6 semanas del tratamiento con el equipo hidrómetro.

Humedad

Al igual que los otros parámetros importantes este se midió tres veces a la semana, los días lunes, miércoles, viernes durante las 6 semanas del tratamiento.

Al inicio se alcanzó una humedad del 75 %, es decir para 12 Kg de suelo se utilizaron 5 litros de agua.

Calculo de la humedad en % (J 2017)

$$H = \frac{ph-ps}{ps} * 100 \quad \text{Ecuación N° 1-2}$$

Donde:

H: es el porcentaje de humedad

ph: es el peso del suelo húmedo

ps: es el peso del suelo seco

Donde la cantidad de agua es (0,05 L +_0,1) representa el 70 % - 80 % de humedad en el suelo para los 2 Kg de suelo.



Figura 19-2: Control de parámetros en los tratamientos.
Realizado por: Enitt Lemache, 2017

2.4.3. Control de crecimiento del hongo

Aquí se realizó un control de crecimiento del hongo midiéndole pasando un día el primordio del hongo en cm durante las 6 semanas del tratamiento de remoción de metales.



Figura 20-2: Control del crecimiento del hongo.
Realizado por: Enitt Lemache, 2017.

CAPITULO III

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 RESULTADOS

Tabla 1-3 Caracterización inicial del suelo contaminado

Análisis solicitado	Valores	Método/Norma Referencia	Criterio de calidad del suelo límite máximo	Unidad	Observación
Cadmio	3,32	PEE/CESTTA/76 EPA SW-846 N 3050B, 7130	0,5	mg/Kg	Fuera de norma
Plomo	25	PEE/CESTTA//78 EPA SW- 846 N 3050, 7420	19	mg/Kg	Fuera de norma

Fuente: Análisis realizados en el laboratorio CESTTA.

Realizado por: Enitt Lemache, 2017.

Tabla 2-3 Resultados finales del suelo contaminado.

PARÁMETROS	RESULTADO FINAL								UNIDAD
	MUESTRAS	INICIO	TRATAMIENTOS						
			MSCPCaR1	MSCPCaR2	MSCPCaR3	MSCPCeR1	MSCPCeR2	MSCPCeR3	
Cadmio	MSC	3,32	0,33	0,22	0,36	0,42	0,38	0,28	mg/Kg
Plomo	MSC	25	10,12	12,33	11,33	15,22	14,12	12,32	mg/Kg

Realizado por: Enitt Lemache, 2017.

Tabla 3-3: Resultados finales de la eficiencia de remoción de metales en el suelo

Eficiencia de remoción de metales				
Cacao	Cd	90,1%	93,4%	89,2%
	Pb	59,5%	50,7%	54,7%
Cebada	Cd	87,3%	88,6%	91,6%
	Pb	39,1%	43,5%	50,7%

Realizado por: Enitt Lemache, 2017.

Tabla 4-3: Resultados de control de la temperatura.

MUESTRAS	TEMPERATURA (°C)																	
	SEMANA 1			SEMANA 2			SEMANA 3			SEMANA 4			SEMANA 5			SEMANA 6		
	Lun	Mier	Vier	Lun	Mier	Vier	Lun	Mier	Vier	Lun	Mier	Vier	Lun	Mier	Vier	Lun	Mier	Vier
MSCPCaR1	11	12	12	12	13	11	12	12	12	14	12	14	16	17	18	14	12	14
MSCPCaR2	12	13	13	13	14	15	14	15	13	14	13	12	14	14	16	14	14	12
MSCPCaR3	11	12	13	12	13	13	13	12	12	12	14	14	12	14	14	14	16	14
MSCPCeR1	13	12	11	11	12	12	13	14	14	14	16	12	14	14	16	18	18	14
MSCPCeR2	14	13	12	12	13	13	13	12	15	12	14	16	14	12	14	14	16	16
MSCPCeR3	12	13	12	12	14	15	15	17	18	16	14	14	14	12	12	14	12	11

Realizado por: Enitt Lemache

Tabla 5-3: Resultados de control de pH.

MUESTRAS	pH.																	
	SEMANA 1			SEMANA 2			SEMANA 3			SEMANA 4			SEMANA 5			SEMANA 6		
	Lun	Mier	Vier	Lun	Mier	Vier	Lun	Mier	Vier	Lun	Mier	Vier	Lun	Mier	Vier	Lun	Mier	Vier
MSCPCaR1	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	9
MSCPCaR2	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
MSCPCaR3	8	8	8	8	9	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
MSCPCeR1	9	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
MSCPCeR2	9	8	8	8	9	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
MSCPCeR3	9	8	8	8	8	8	8	8	8	8	7	8	8	8	8	8	8	8

Realizado por: Enitt Lemache

Tabla 6-3: Resultados de control de la humedad.

MUESTRAS	HUMEDAD %																	
	SEMANA 1			SEMANA 2			SEMANA 3			SEMANA 4			SEMANA 5			SEMANA 6		
	Lun	Mier	Vier	Lun	Mier	Vier	Lun	Mier	Vier	Lun	Mier	Vier	Lun	Mier	Vier	Lun	Mier	Vier
MSCPCaR1	70	70	70	80	80	80	80	80	80	70	70	70	80	80	80	70	80	80
MSCPCaR2	70	70	70	70	80	80	70	70	80	70	70	70	70	80	80	80	80	70
MSCPCaR3	70	70	70	70	80	80	70	80	80	70	70	70	80	80	80	70	70	70
MSCPCeR1	70	70	70	80	80	80	80	80	80	80	80	80	70	90	90	60	60	70
MSCPCeR2	70	70	70	80	70	80	60	70	70	70	70	80	80	80	80	70	80	80
MSCPCeR3	70	70	70	80	80	80	60	70	80	60	80	80	70	70	70	70	80	80

Realizado por: Enitt Lemache

Tabla 7-3: Crecimiento del hongo *Pleurotus ostreatus* (cm).

MUESTRAS	CRECIMIENTO O DESARROLLO DEL HONGO <i>Pleurotus Ostreatus</i> (cm)																	
	SEMANA 1			SEMANA 2			SEMANA 3			SEMANA 4			SEMANA 5			SEMANA 6		
	Lun	Mier	Vier	Lun	mier	Vier	Lun	mier	Vier	Lun	Mier	Vier	Lun	Mier	Vier	Lun	Mier	Vier
MSCPCaR1	0	0	0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,4	0,4	0,6	0,8	0,8	0,9	1,2	1,5	2
MSCPCaR2	0	0	0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,3	0,4	0,4	0,7	0,8	1	1,5	1,8	2,5
MSCPCaR3	0	0	0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,3	0,4	0,6	0,8	0,9	1,2	1,3	1,5	1,8
MSCPCeR1	0	0	0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5	0,8	1	1,5
MSCPCeR2	0	0	0	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3	0,8	0,9	0,9	1	1,2	1,8
MSCPCeR3	0	0	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,3	0,4	0,4	0,5	0,8	1,1	1,9

Realizado por: Enitt Lemache

3.2 DISCUSIÓN

Mediante los análisis de espectrofotometría de absorción atómica realizados en los tratamientos de suelo contaminado con plomo y cadmio se obtuvieron los siguientes resultados y utilizando la prueba estadística t student se realizó la comparación de medias para dos muestras iguales las cuales determinaron cuál de los tratamientos es el más eficiente para la remoción de los metales en estudio, se analizaron todos los tratamientos con sus respectivas repeticiones y unidades de control. A continuación, se muestran los resultados:

Tabla 8-3: Remoción de metales en el suelo.

PARÁMETROS	METODO-PROCEDIMIENTO	RESULTADO									
		MUESTRAS	INICIO	FINAL						UNIDAD	LIMITE PERMISIBLE
				MSCPCaR1	MSCPCaR2	MSCPCaR3	MSCPCeR1	MSCPCeR2	MSCPCeR3		
Cadmio	absorción atómica	MSC	3,32	0,33	0,22	0,36	0,42	0,38	0,28	mg/Kg	0,5
Plomo	absorción atómica	MSC	25	10,12	12,33	11,33	15,22	14,12	12,32	mg/Kg	19
Eficiencia				90,1%	93,4%	89,2%	87,3%	88,6%	91,6%		
				59,5%	50,7%	54,7%	39,1%	43,5%	50,7%		

Porcentajes de remoción de metales				
Cacao	Cd	90,1%	93,4%	89,2%
	Pb	59,5%	50,7%	54,7%
Cebada	Cd	87,3%	88,6%	91,6%
	Pb	39,1%	43,5%	50,7%

Realizado por: Enitt Lemache, 2017.

Tabla 9-3: Análisis T para muestras iguales, suponiendo varianzas iguales

	CACAO	CEBADA	t
Cd	90,90%	89,20%	NS
Pb	55,00%	44,50%	NS
t	***	***	

Realizado por: Enitt Lemache, 2017.

La comparación de los porcentajes medios de remoción de los metales cadmio y plomo para cada sustrato de cacao y tamo de cebada se realizó con el análisis estadístico t student, cuyos resultados indican que existen diferencias significativas al valor de $p < 0,001$.

Para los dos sustratos la remoción de cadmio fue significativamente mayor de cadmio que la de plomo.

Para los dos sustratos, la remoción media de cada metal es similar.

Los porcentajes estipulados indican que existe una mayor remoción de cadmio con un valor de 90,90 % en el sustrato de cacao, este resultado radica en que probablemente la biomasa puede influenciar en varios sitios de unión con los sulfuros, carbonatos, fosfatos, entre otros, y por ende estos pueden ayudar al proceso de absorción de este metal y también por lo que el sustrato de cacao tiene propiedades químicas donde los cationes encontrados en el suelo son capaces de unirse a la pared celular del hongo con una mayor facilidad. El valor de remoción de plomo con el sustrato de cacao fue de 55 % mucho menor que la de cadmio debido a que este metal no se adhiere con mucha facilidad a la pared celular del hongo (Morales et, al, 2008).

Para los valores de cadmio con el sustrato de cebada se obtuvo una remoción de 89,20 % y para el plomo un valor de 44,50 % ya que en este caso el sustrato utilizado no tuvo mayor importancia en la remoción de este metal, debido a que las propiedades físicas y químicas de este sustrato no son tan buenas, por lo que este tipo de sustrato tiene un bajo valor nutritivo y por ende el que realiza en si la remoción de este es el hongo, el cual tiene la capacidad de absorber metales en su pared celular (Baldrian 2001).

Algunos estudios realizados anteriormente demuestran que el hongo *Pleurotus Ostreatus* es un excelente removedor de metales pesados, también a otros factores que influyen en la remoción de estos metales, entre ellos están la cantidad de biomasa existente en el suelo, la cantidad de sustrato utilizado en esta biorremediación, pero por lo general estos hongos revelan una mayor eficiencia de captación de cadmio y plomo, su capacidad de adherir este tipo de metales a la pared celular es mayor debido a la temperatura con la que se trabaja, el pH, competencia de iones y cationes entre otros, también por lo que este tipo de hongos no tiene ningún complejo en actuar con la flora bacteriana del lugar (Baldrian, 2001).

CRECIMIENTO DEL HONGO

Tabla 10-3: Prueba F para varianzas de dos muestras

	Cacao	Cebada
Media	0,546296296	0,392592593
Varianza	0,404613169	0,209020576
Observaciones	6	6
Grados de libertad	5	5
F	1,9357576	
P(F<=f) una cola	0,242973069	
Valor crítico para F (una cola)	5,050329058	

Realizado por: Enitt Lemache, 2017

Tabla 11-3: Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales

	Cacao	Cebada
Media	0,546296296	0,392592593
Varianza	0,404613169	0,209020576
Observaciones		6
Varianza agrupada	0,306816872	
Diferencia hipotética de las medias		0
Grados de libertad		10
Estadístico t	0,480623875	
P(T<=t) una cola	0,320562689	
Valor crítico de t (una cola)	1,812461123	
P(T<=t) dos colas	0,641125378	
Valor crítico de t (dos colas)	2,228138852	

Realizado por: Enitt Lemache, 2017

	Semanas					
	1	2	3	4	5	6
Cacao	0,00	0,10	0,20	0,42	0,88	1,68
Cebada	0,00	0,10	0,17	0,28	0,58	1,23

Realizado por: Enitt Lemache, 2017

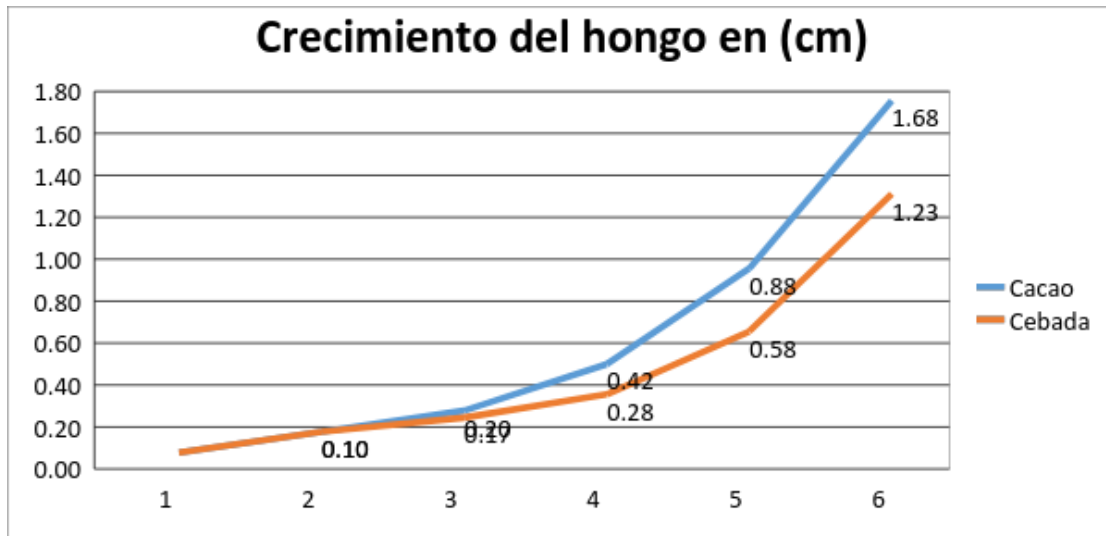


Gráfico 1-3: Evaluación del crecimiento del hongo
Realizado por: Enitt Lemache, 2017.

Según el análisis estadístico el valor de ($p > 0,05$) se comprueba que no existen diferencias significativas entre los promedios de crecimiento del micelio del hongo *pleurotus ostreatus* entre los dos sustratos de cacao y cebada, por ende se obtuvieron valores de máximos y mínimos de crecimiento, con un valor máximo de 1.68 cm en las 6 semanas que se llevó el tratamiento con el sustrato de cacao fue excelente debido a que este sustrato presenta sustancias químicas atractivas y nutritivas para la alimentación del hongo, entre las cuales podemos mencionar azúcares libres, proteínas, fibra y sobretodo lo más importante la presencia de lignina, también contiene un porcentaje muy considerable de celulosa y hemicelulosa, una aportación considerable son la vitamina A y C, también este sustrato es rico en ácido oleico, ácido linoleico, y antioxidantes y por ende gracias a todas estas propiedades se denomina que es un excelente suplemento nutritivo para reponer fuerzas para el crecimiento óptimo de hongo, siempre y cuando también se controlen ciertos parámetros para su crecimiento, dentro de los cuales se menciona los más importantes como son la temperatura, luminosidad, humedad, etc. (Ramos Ivan, 1999).

En cambio con el sustrato de cebada el valor fue de 1,23 siendo el máximo de crecimiento durante el tiempo de tratamiento que también fueron las 6 semanas al igual que el tratamiento con cacao, es decir este sustrato es eficiente pero no en su totalidad como el cacao, pero contiene en su mayor proporción vitaminas B, siendo también una buena fuente de potasio, magnesio y fósforo, pero su mayor virtud es la riqueza en oligoelementos (hierro, azufre, cobre, zinc, manganeso, cromo, selenio, yodo, molibdeno), conteniendo un 94 % de materia orgánica y en un menor porcentaje contiene lisina (aminoácido limitante en el trigo), este sustrato no contiene una cantidad suficiente de fibra que necesita el hongo pero estos conlleva a un crecimiento esperado por la capacidad degradativa que

tiene el hongo, en algunos casos esta suele ser limitada por la estructura cristalina de celulosa y por la existencia de enlaces covalentes como la lignina (Carvajal 2010).

CONCLUSIONES

- Se comprobó que la eficiencia del hongo *Pleurotus ostreatus* como removedor de metales pesados es muy alta, debido a que las hifas de este hongo tiene la capacidad de adherir en su pared celular la mayor concentración de contaminantes existentes en el suelo agrícola de la zona el Timbre, obteniendo como resultado un porcentaje máximo de remoción para el cadmio con el sustrato de cacao con un valor de 90,20 % y de plomo con un valor de 55 % y para el sustrato de cebada se removió el cadmio en un 89,20 % de cadmio y 44,5 de plomo. Siendo el mayor metal removido el cadmio con los dos sustratos, esto comprueba que el hongo puede ser aplicado perfectamente en procesos de biorremediación para suelos contaminados.
- Se concluye que la efectividad del sustrato utilizado para el crecimiento del *Pleurotus ostreatus* es casi similar por lo que no existen diferencias significativas en el crecimiento con los dos sustratos llegando a un crecimiento máximo de 1,68 cm en cacao y 1,23 cm en el sustrato de cebada en las seis semanas de prueba.
- Se determinó que el hongo de la podredumbre blanca *Pleurotus ostreatus* se comporta de una manera especial ante cada metal, debido a que el mayor porcentaje de absorción fue con el metal cadmio por lo que este metal tiene la mayor facilidad de adherirse a la pared celular del hongo en suelos y en un menor porcentaje de absorción con el plomo debido a su baja capacidad de fijarse en la misma pared celular del hongo.

RECOMENDACIONES

- ✓ Para llevar a cabo una excelente investigación de este tipo se recomienda que al momento de masificar este tipo de hongo se lo realizó con los mayores cuidados posibles, debido a que este puede contaminarse con mayor facilidad por microorganismos existentes en el medio ambiente.
- ✓ Se recomienda que al momento de esterilizar los sustratos se los realice más de dos veces para una mayor eficacia de propagación del micelio.
- ✓ Al momento de realizar el muestreo de suelos se recomienda que se tomen varias muestras en diferentes puntos del mismo lugar, para realizar una homogenización confiable.
- ✓ Se recomienda que al momento de controlar los parámetros en los tratamientos se los haga frecuentemente, debido a que las condiciones del clima pueden variar según los días y según las estaciones en que se estén llevando a cabo la biorremediación.
- ✓ Se recomienda que al momento de realizar los tratamientos se enumere las repeticiones de acuerdo a cada sustrato.
- ✓ Al momento de realizar las mediciones de crecimiento del hongo se recomienda no exponer las macetas de tratamiento a algún contaminante.
- ✓ Se recomienda realizar campañas de educación ambiental en la Zona el Timbre sobre las causas que produce las fumigaciones al aire libre y la aplicación de insecticidas y plaguicidas en el suelo.

BIBLIOGRAFÍA

1. **ACTON, D & GREGORICH, L.** *The Health of Our Soils: Toward sustainable agriculture in Canada* [en línea]. Canada. 1995. Agriculture and Agri-Food Canada. [Consulta: 29 marzo 2017]. Disponible en: http://sis.agr.gc.ca/cansis/publications/manuals/1995-health/The_Health_of_Our_Soils.pdf
2. **AGUILAR, Leticia.** Producción de inóculo líquido para el cultivo de *Pleurotus* spp (tesis). (Maestría). Instituto Politécnico Nacional. México. 2007, p. 24. [Consulta: 23 de enero de 2017]. Disponible en: <http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/595/tesisfinal240807lety.pdf?sequence=>>
3. **AIRAM, M.** *Riesgos ambientales. Impacto ambiental del plomo y mercurio* [en línea]. Harold, 2012. [Consulta: 19 de junio de 2017]. Disponible en: http://riesgosambientalespm.blogspot.com/2012/10/plomo_7259.html
4. **ALEGRIA COTO, J., et al.** " Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente". *Revista Química viva* [en línea], (2003), (España). pp. 1-6. [Consulta: 25 marzo 2017]. ISSN 1666-7948. Disponible en: <http://www.redalyc.org/html/863/86320303/>
5. **ALEGRÍA COTO, J., et al.** *Biotecnología y biorremediación.* [en línea]. El Salvador. CONACYT. 2013. Tecnologías de biorremediación. [Consulta: 24 marzo 2017]. Disponible en: <http://redicces.org.sv/jspui/bitstream/10972/2429/1/biotecnologia%20y%20bioremediacion.pdf>
6. **AVELLANEDA CUSARÍA, Alfonso.** *Gestión Ambiental y Planificación del desarrollo.* 2ª ed., Bogotá - Colombia: Kimpres Ltda, 2007, pp. 117 - 253. [Consulta: 22 enero 2016]. Disponible en: <https://www.ecoediciones.com/wp-content/uploads/2015/04/Gesti%C3%B3n-ambiental-y-planificaci%C3%B3n-del-desarrollo-3ra-Edici%C3%B3n.pdf>
7. **BALDARIAN, P.** Interactions of heavy metals with white – rot fungi-enzyme and microbial 32 78-91. *Elsevier* [en línea]. 2002, (USA). 14(1), pp. 5-17. [Consulta: 13 de enero de 2017]. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(80\)90122-9](https://doi.org/10.1016/0048-9697(80)90122-9)

8. **BERROCAL, Francisco & RODRIGUEZ, Manuel.** Aplicación de los plaguicidas. Nivel básico manual. 2° ed, s.f, pp. 26-29

9. **BOLLAG, J & LEONOWICZ, A.** “Comparative Studies of Extracellular Fungal Laccases”. *Appl Environ Microbiol.* [en línea], vol. 4, n° 48, (1984), pp. 849–854. [Consulta: 03 de mayo de 2017]. Disponible en: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC241625/>>

10. **BOURG, A.** “Speciation of heavy metals in soils and groundwater and implications for their natural and provoked mobility”. *Environmental science.* [en línea], 1995, (Berlin), pp. 19-31. [Consulta: 25 febrero 2017]. Disponible en: <https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-642-79316-5_2>

11. **BOWEN, H.** *Environmental chemistry of the elements.* [en línea], 1979, (New York), pp. 1-3. [Consulta: 26 febrero 2017]. ISSN 0122-8706. Disponible en: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-79316-5_3>

12. **BOWIE, S & THORNTON.** *Environmental Geochemistry and Health.* [En línea]. [Consulta: 27 febrero 2017]. Disponible en: <<http://trove.nla.gov.au/work/18618575?selectedversion=NBD3664437>>

13. **BRISSIO, Pedro A.** *Evaluación preliminar del estado de contaminación en suelos de la provincia del Neuquén donde se efectúan actividades de explotación hidrocarburífera.* [blog]. Buenos Aires - Argentina, 2010. [Consulta: 19 agosto 2016]. Disponible en: <<http://tesis.bioetica.org/pab2-3.htm>>

14. **BROWN, Theodore L.** Química de Bronw [en línea]. México: Pearson Educación, 2014. p. 173. [Consulta: 28 septiembre 2016]. Disponible en: <<http://www.bibliotechnia.com.mx/portal/visor/web/visor.php>>

15. **BUSTOS AYOVI, Fernando.** "Manual de gestión y control ambiental". 3ª ed. Quito - Ecuador: R.N. Industria Gráfica, 2008, p. 118

16. **CAÑIZARES VILLANUEVA, ROSA OLIVIA.** “Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa”. *Revista ALAM* [en línea]. México. 2011, p. 5. [Consulta: 15 octubre 2016]. Disponible en: <<http://www.medigraphic.com/pdfs/lamico/mi-2000/mi003f.pdf>>
17. **CARVAJAL, Grace.** Evaluación de la producción del hongo *Pleurotus Ostreatus* sobre cinco tipos de sustratos: tamo de cebada, tamo de trigo, tamo de vicia, tamo de avena y paja de paramo, enriquecidos con la tuza molida, afrecho de cebada y carbonato de calcio (tesis). (Ingeniería). Universidad Católica del Ecuador sede Ibarra. Ibarra – Ecuador. 2010, p. 35. [Consulta: 08 de febrero de 2017]. Disponible en: <<https://es.scribd.com/document/275261726/EVALUACION-DE-LA-PRODUCCION-DEL-HONGO-Pleurotus-ostreatus-SOBRE-CINCO-TIPOS-DE-SUSTRATOS-TAMO-DE-TRIGO-TAMO-DE-CEBADA-TAMO-DE-VICIA-TAMO-DE-AVENA>>
18. **CHUQUÍN ENRÍQUEZ, Cristian Andrés.** Estudio de la viabilidad de crecimiento del hongo *Pleurotus Ostreatus* aplicado en inóculo líquido para uso en biorremediación [en línea] (tesis). (Ingeniería). Escuela Superior Politécnica De Chimborazo, Riobamba, Ecuador. 2016. pp. 27-30. [Consulta: 13 octubre 2016]. Disponible en: <<http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/2641/1/236T0073.pdf>>
19. **COHEN, R.** “Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus *Pleurotus*”. *Appl Microbiol Biotechnol* [en línea], vol. 1, n° 58, 2002, (USA), pp. 82-97. [Consulta: 23 de abril de 2017]. Disponible en: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11956739>>
20. **DAVILA, Gustavo; et al.** Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales [en línea]. Cuernavaca - México: Instituto de Biotecnología Universidad Nacional Autónoma de México, 2001. Enzimas lignolíticas, pp. [Consulta: 14 febrero 2017]. Disponible en: <https://www.researchgate.net/profile/Gustavo_DavilaVazquez/publication/259781170_Enzimas_ligninoliticass_fungicas_para_fines_ambientales/links/0c96052dd62518e30a000000/Enzimas_ligninoliticass_fungicas_para_fines_ambientales.pdf>

21. **ERÓSTEGUI REVILLA, Carlos.** “Contaminación Por Metales Pesados”. *Revista Scielo* [en línea], Bolivia. 2010, vol 2, n° 1, ISSN 2077-3323, p. 2. [Consulta: 22 noviembre 2015]. Disponible en: <http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1817-74332009000100013>
22. **FERNÁNDEZ, Maíke; RODRÍGUEZ, Suyén; BERMÚDEZ, Rosa C.** “Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus spp*”. *Revista Reviberoammico* [en línea], Cuba. 2013, vol 20, n° 3, pp. 164-165. [Consulta: 17 octubre 2016]. Disponible en: <<http://www.reviberoammicol.com/2003-20/164168.pdf>>
23. **FUENTES, Javier.** *Granada natural (imagen Pleurotus ostreatus)* [blog].2009, pp. 1. [Consulta: 20 julio 2016]. Disponible en: <http://www.gradanatural.com/ficha_hongos.php?cod=234>
24. **GALAN, E.** “The role of clay minerals in removing and immobilising heavy metals from contaminated soils”. *Canadian Geotechnical Journal* [en línea], 2000, (Canada) vol. 37 (núm. 2), pp.296-307. [Consulta: 25 febrero 2017]. Disponible en: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/pdf/10.1139/t99-106>>
25. **GALAN, E., ROMERO, A.** Contaminación de suelos por Metales Pesados [en línea]. Sevilla. 2001. National Research Council. [Consulta: 20 marzo 2017]. Disponible en: <http://www.ehu.es/sem/macla_pdf/macla10/Macla10_48.pdf>
26. **GARBISU, C., et al.** "Biorremediación y Ecología". *Revista Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente* [en línea], (2002), (España). pp. 1-5. [Consulta: 25 marzo 2017]. Disponible en: <<http://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/viewFile/591/558>>
27. **GIANFREDA, Liliana; et al.** “Laccases: A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes”, *Journal bioremediation* [en línea], vol. 3, n° 3, (1999). pp. 1-26. [Consulta: 03 de junio de 2017]. Disponible en: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10889869991219163>>
28. **GLYNN, Henry; GARY, Heinke.** *Ingeniería Ambiental*. 2ª ed. México: MEG WEIST. 1999, pp. 293 - 294.

29. **HERNÁNDEZ, Lesly.** *Efectos del plomo, aluminio, mercurio y arsénico sobre el cuerpo humano* [blog]. 2015. [Consulta: 10 septiembre 2016]. Disponible en: <<https://lesly0098.wordpress.com/2015/07/29/efectos-del-plomo-aluminiomercurio-y-asernico-sobre-el-cuerpo-humano/>>
30. **HERNANDEZ, R.; LOPEZ, C.** Evaluación del crecimiento y producción de *Pleurotus Ostreatus* sobre diferentes residuos agroindustriales del departamento de Cundinamarca [en línea]. (Tesis), (Ingeniería), 2003. Politécnica Nacional Javeriana. Colombia, pp: 54-59, 86-88. [Consulta: 20 febrero 2017]. Disponible en: <<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis257.pdf>>
31. **HURTADO, Hector.** Evaluación del crecimiento y producción de *Pleurotus ostreatus* sobre diferentes residuos agroindustriales del departamento de Cundinamarca [en línea]. (TESIS). (Ingeniería). 2011. Pontificia Universidad Javerina. Bogotá. p 30. [Consulta: 03 octubre 2016]. Disponible en: <<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis257.pdf>>
32. **LENNTECH.** *Propiedades químicas del Cadmio. Efectos del Cadmio sobre la salud. Efectos ambientales del Cadmio* [en línea]. Lenntech, s.f. [Consulta: 21 de junio de 2017]. Disponible en: <<http://www.lenntech.es/periodica/elementos/cd.htm#ixzz4qtCcFU9l>>
33. **MARTÍN M. et al.,** “Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación”. *Rev Iberoam Micol*, vol 1, n°21. (2004). (Madrid-España) pp. 103-120. [Consulta: 24 febrero 2017]. Disponible en: <<http://www.reviberoammicol.com/2004-21/103120.pdf>>
34. **MORALES, Diana & RUIZ, Katherine.** Determinación de la capacidad de remoción de cadmio y plomo por hongos de la podredumbre blanca inmovilizados (tesis). (Ingeniería). Pontifica Universidad Javeriana. Bogota – Colombia. 2008, pp. 71-72.80. [Consulta: 29 de enero de 2017]. Disponible en: <<http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis148.pdf>>
35. **NEWMAN, M. & JAGOE, C.** *Bioavailability-Physical, Chemical, and Biological Interactions*, [en línea]. Tokyo: editorial, Jerry L., 1994, pp.39-61. [Consulta: 29 marzo 2017]. Disponible en:

<[https://books.google.com.ec/books?id=aBiVuAq3oCsC&pg=PA39&lpg=PA39&dq=\):+Inorganic+toxic+ligands+and+the+bioavailability+of+metals+in+aquatic+environment](https://books.google.com.ec/books?id=aBiVuAq3oCsC&pg=PA39&lpg=PA39&dq=):+Inorganic+toxic+ligands+and+the+bioavailability+of+metals+in+aquatic+environment)>

36. **NOVOTNY, V.** “Diffuse sources of pollution by toxic metals and impact on receiving waters”. *Environmental Science* [en línea], 1995, (Berlin), pp. 33-52. [Consulta: 26 febrero 2017]. Disponible en: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-79316-5_3>
37. **OLGUÍN J. Eugenia.** “Manejo Integral de los residuos sólidos”. *Rev. SOLABIAA* [en línea]. México. (2012), vol. 3, n° 1, pp. 12. [Consulta: 20 junio 2016]. Disponible en: <<http://www.lasallista.edu.co/fxcul/media/pdf/Revista/Vol1n1/015-021%20Impacto%20del%20manejo%20integral%20de%20los%20residuos%20s%C3%B3lidos%20en%20la%20CUL.pdf>>
38. **PAREDES COELLO & MARISOL J.** Aplicación de hongo *Pleurotus ostreatus* como alternativa para la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados [en línea], (tesis), (Ingeniería) Universidad Escuela Superior Politécnica Del Litoral, Guayaquil, Ecuador. 2011. pp 12-15. [Consulta: 24 noviembre 2015]. Disponible: <<https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/21150/1/D-92862.pdf>>
39. **PAZOS, Mabel S.** Disponibilidad de cobre, hierro, manganeso, zinc en suelos. *Revista Scielo* [en línea], Argentina. 2012, vol. 25, n° 1, ISSN 1850-2067, p. 3. [Consulta: 07 julio 2016]. Disponible en: <<http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sciarttext&pid=S18177433200900010001-3>>
40. **PRIEO MÉNDEZ, Judith.** Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales. *Revista Redalyc*, [en línea], México. 2012, vol. 10, n° 1, pp. 29-30. [Consulta: 20 noviembre 2015]. Disponible en: <<http://www.redalyc.org/pdf/939/93911243003.pdf>>
41. **RAMOS, Germania.** *Pleurotus ostreatus* cultivado en residuos de palma aceitera como importante fuente proteica para la dieta humana (tesis). (Ingeniería). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador, 2007, pp. [Consulta: 23 de enero de 2017]. Disponible en: <<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/221/1/236T0002.pdf>>

42. **RAMOS, Ivan.** Produccion de pleurotus ostreatus var Florida sobre residuos de cacao (tesis). (Ingeniería). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba – Ecuador. 1999, pp. 23-24. [Consulta: 20 de febrero de 2017]. Disponible en: <http://bibliotecas.esPOCH.edu.ec/cgi-bin/koha/opacdetail.pl?biblionumber=41796_&shelfbrowse_itemnumber=60423#>
43. **RODRIGUEZ A. Ismael; & GONZÁLEZ C. Juan.** “Uso de diferentes biomásas para la eliminación de metales pesados de sitios contaminados”. *Revista Concyteg* [en línea]. México. 2012, vol. 7, n° 85, pp. 911-919. [Consultado: 22 noviembre 2015]. Disponible en: <http://www.semanaciencia.guanajuato.gob.mx/ideasConcyteg/Archivos/85_3_ACOSTA_RODRIGUEZ_ET_AL.pdf>
44. **RULKENS, W., GROTENHUIS, J., TICHY, T.** “Methods for cleaning contaminated soils and sediments.”. *Environmental science*. [en línea], 1995, (Berlin), pp. 165-191. [Consulta: 25 febrero 2017]. Disponible en: <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-79316-5_11>
45. **SÁNCHEZ, Martín & SÁNCHEZ Camazano.** Los plaguicidas. Adsorción y evolución en el suelo. 1ª edición. 2010, pp. 7-8.
46. **SPOSITO, Garrison.** *The chemistry of soils*. [En línea]. Oxford University Press, New York – Estados Unidos. 1989. p. 1. [Consulta: 25 marzo 2017]. Disponible en: <<https://global.oup.com/academic/product/thechemistryofsoils9780195313697?cc=us&lang=en&>>
47. **TULSMA.** *Texto Unificado de Legislación Ambiental del Ministerio del Ambiente.*
48. **VULLO, D.** "Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente". *Revista Química viva* [en línea], (2003), (España). pp. 1-6. [Consulta: 25 marzo 2017]. ISSN 1666-7948. Disponible en: <<http://www.redalyc.org/html/863/86320303/>>
49. **YANEZ, Guido.** Introducción a la micología. 1ª edición. Buenos Aires – Argentina: Editorial universitaria de Buenos Aires. 1964, pp. 444.

ANEXOS

ANEXO A: REACTIVACIÓN DE LA CEPA *Pleurotus ostreatus*



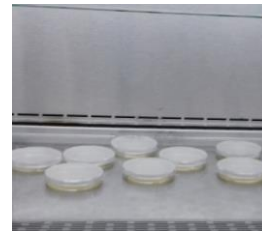
Fotografía 1A: Preparación de PDA en agua destilada 200ml



Fotografía 2A: Esterilización en la autoclave del medio de cultivo PDA



Fotografía 3A: Medio de cultivo PDA dispersado en 10 cajas Petri



Fotografía 4A: Incubación de la cepa *Peurotus ostreatus*

ANEXO B: MASIFICACIÓN DE LA CEPA MICROBIANA EN TRIGO



Fotografía 1B: Limpieza de impurezas en los granos de trigo



Fotografía 2B: Lavado de los granos de trigo, para mayor eficiencia lavar tres veces



Fotografía 3B: Envasado de los granos de trigo en 6 envases de vidrio



Fotografía 4B: Esterilizado de los granos de trigo, por lo general se deben hacer tres veces



Fotografía 5B: Masificación de la cepa en los granos de trigo



Fotografía 6B: Desarrollo de la cepa en los granos de trigo

ANEXO C: MASIFICACIÓN DE LA CEPA MICROBIANA EN LOS RESIDUOS DE CASCARA DE CACAO Y TAMO DE CEBADA



Fotografía 1C: Selección de los sustratos de cacao y cebada



Fotografía 2C: Lavado de los sustratos de cacao y cebada, como mínimo realizar 3 lavados



Fotografía 3C: Enfundado de los sustratos ya esterilizados, 1 kg de sustrato por funda



Fotografía 4C: Masificación de la cepa microbiana en los sustratos de cascara de cacao



Fotografía 5C: Masificación de la cepa microbiana en los sustratos de tamo de cebada



Fotografía 6C: Desarrollo de la cepa microbiana en los dos sustratos, durante 15 días

ANEXO D: MUESTREO DE SUELOS EN LA ZONA EL TIMBRE



Fotografía 1D: Identificación del lugar de muestreo de suelos.



Fotografía 2D: Identificación de las zonas afectadas.



Fotografía 3D: Muestreo por calicatas aproximadamente 30 cm de profundidad.



Fotografía 4D: Excavación de los puntos de muestreo.



Fotografía 5D: Recolección de muestras de suelo contaminado, aproximadamente 1 Kg.



Fotografía 6D: Recolección de muestras de suelo en diferentes puntos de la zona.

ANEXO E: ARMADO DE LAS MACETAS PARA LOS TRATAMIENTOS DE SUELO CONTAMINADO



Fotografía 1E: Tres repeticiones de suelo contaminado para el sustrato con cacao.



Fotografía 2E: Tres repeticiones de suelo contaminado para el sustrato con cebada.



Fotografía 3E: Mezcla de suelo contaminado con pleurotus y cascara de cacao.



Fotografía 4E: Mezcla de suelo contaminado con pleurotus y tamo de cebada.



Fotografía 5E: Tratamientos finales,



Fotografía 6E: Tratamientos finales.

ANEXO F: OTROS ANALISIS



Fotografía 1F: Análisis de medición de la conductividad.



Fotografía 2F: Análisis de medición de pH.



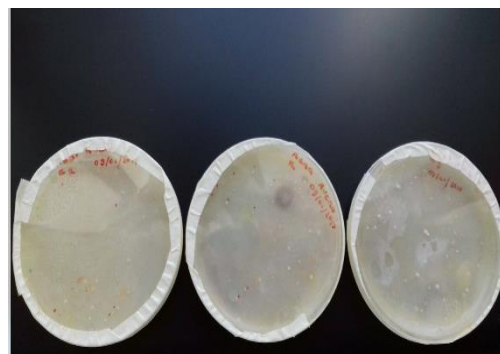
Fotografía 3F: Medición de humedad.



Fotografía 4F: Análisis microbiológicos del suelo.



Fotografía 5F: Análisis microbiológicos.



Fotografía 6F: control de microorganismos.