

# Aplicación del Hongo *Pleurotus Ostreatus* como Alternativa para la Biorremediación de Suelos Contaminados con Metales Pesados.

J.M. Coello, F. Burgos

Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceánicas y Recursos Naturales

Escuela Superior Politécnica del Litoral (ESPOL)

Campus Gustavo Galindo, Km. 30.5 vía Perimetral

Apartado 09-01-5863 Guayaquil-Ecuador

[jmcoello@espol.edu.ec](mailto:jmcoello@espol.edu.ec), [faburgo@espol.edu.ec](mailto:faburgo@espol.edu.ec)

## Resumen

*Los contaminantes como metales pesados tienen la capacidad de provocar cambios evolutivos debido a sus efectos dañinos. El manejo inadecuado de los materiales y residuos peligrosos ha generado a nivel mundial, un problema de contaminación de los suelos y cuerpos de agua que han provocado un deterioro creciente de las fuentes de abastecimiento de agua potable. Es en base a este mal manejo que aumenta la demanda por buscar maneras económicas y sencillas de conservar limpias las áreas naturales, aquellas que han sido contaminadas por las acciones del hombre. Usando la Biotecnología como herramienta principal, se creará un método experimental que describa el uso del hongo *Pleurotus Ostreatus* como Biorremediador, para suelos que contiene niveles tóxicos de metales pesados.*

**Palabras Claves:** *Biorremediación, Biorremediador, Hongos, *Pleurotus Ostreatus*, Suelos Contaminados, Metales Pesados.*

## Abstract

*Contaminants like Heavy metals have a capacity to cause a evolutive's changes because of their harmful effects. The wrong management of the materials and residue's damages has been created in the entire world a contamination problem into water bodies and lands that's prompted a deterioration of water supply fountain. Based on this wrong management that increases the demand for look up economics and simples ways of preserve the natural areas clean, those that have been contaminated by the man's actions, using Biotehcnology like principal tool, are going to create an experimental method that describes the use of the *Pleurotes Ostreatus* hongo like Bioremediator for lands that contain toxic levels of heavy metals.*

**Keywords:** *Bioremediation, Bioremediator, Mushroom, *Pleurotus Ostreatus*, Contaminated land, Heavy Metals*

## 1. Introducción

El uso de sustancias Tóxicas, inorgánicas y orgánicas, en los suelos, tales como plaguicidas, fertilizantes, residuos urbanos, subproductos de transformación de industrias agroalimentarias, etc. así como el vertido accidental de residuos o su enterramiento en lugares inapropiados ha ido agravando en las últimas décadas los problemas de contaminación de suelos y aguas. Actualmente, como consecuencia de la fabricación y elaboración de una gran cantidad de productos y obtención de materias primas, se arrojan a los cauces públicos multitud de sustancias contaminantes que quedan disueltas en el agua o retenidas por las partículas en suspensión y sedimentos. Los ecosistemas terrestres y acuáticos se contaminan además por la liberación de xenobióticos del suelo por las aguas de lluvia y riego que los movilizan y transportan a otros suelos, ríos, lagos y aguas subterráneas.

Entre las más severas contaminaciones destacan las que se produjeron y todavía se producen a causa de los metales pesados porque tienden a bioacumularse, aumenta la concentración de un producto químico en un organismo biológico en un cierto plazo, comparada a la concentración del producto químico en el ambiente. Como elementos de rastro, algunos metales pesados (Cobre, selenio, zinc) son esenciales mantener en el metabolismo del cuerpo humano. Sin embargo, en concentraciones más altas pueden conducir al envenenamiento. El envenenamiento por metales pesado podría resultar, por ejemplo, de la contaminación del agua potable, las altas concentraciones en el aire cerca de fuentes de la emisión, o producto vía la cadena de alimento.

En la actualidad las actividades de las transnacionales mineras y de hidroeléctricas privadas están causando conflictividad social.

En la minería en pequeña escala, por ejemplo, también ha tenido graves implicaciones medioambientales desplazan comunidades, se apropian de extensos territorios, de las aguas, de la biodiversidad, desequilibran la seguridad y soberanía alimentaria de las poblaciones afectadas. Las descargas mineras aportan al ambiente una carga adicional de elementos persistentes y con alto potencial tóxico, muchos de ellos biomagnificables y con largos tiempos de residencia en los suelos.

La explotación minera a gran escala produce un impacto directo en el suelo, flora, fauna y el agua. En la fase de prospección y exploración, se abren caminos, se derriban bosques primarios, intervienen

maquinarias utilizando combustibles contaminantes. En la explotación se utilizan químicos como el cianuro o el mercurio para separar el oro de otros minerales de la naturaleza, que directamente se depositan en los yacimientos hídricos.

El suelo que se pretende biorremediar, contiene niveles tóxicos de metales pesados, por tal motivo se intenta aplicar un proceso para abrir las puertas a un mecanismo económico y sencillo, que tenga el potencial de establecerse como un método válido que se pueda desarrollar y perfeccionar en nuestro país de manera eficiente y pionera.

Actualmente para disminuir los impactos de la bioacumulación existen alternativas de manejo y de eliminación o fijación de dichos metales a través del uso de microorganismos. Entre los microorganismos utilizados encontramos la cepa del hongo *Pleurotus Ostreatus* de la clase basidiomycete, que degradan principalmente la lignina, puede liberar a la celulosa y hemicelulosa del complejo que forman con esta (Reid, 1989)

Muchos estudios se enfocan en la habilidad de estos hongos en la degradación de compuestos persistentes, principalmente los de la familia Phanerochaete donde se encuentra el hongo *Pleurotus Ostreatus*. Estos hongos son efectivos porque producen una enzima extra celular que cataliza una reacción que degrada lignina, un compuesto aromático. Para catalizar estas reacciones poderosas, la enzima requiere peróxido de hidrógeno, lo cual el hongo produce.

El suelo que se pretende biorremediar, contiene niveles tóxicos para los seres humanos: Mercurio (Hg), Plomo (Pb), Cadmio (Cd) y Arsénico (As) son los que presentan el mayor peligro ambiental, debido a su uso extensivo, a su toxicidad y a su amplia distribución.

Muchos estudios como La producción de Enzimas Lignolíticas a partir del Hongo *Pleurotus Ostreatus* y su Aplicación en diversos procesos ambientales. Se enfocan en la habilidad de estos hongos para la degradación de compuestos persistentes, mostrando que es una tecnología muy prometedora. Se utilizó una cepa de *Pleurotus Ostreatus*, el cual se propago en medio Papa Dextrosa Agar PDA, para la producción de enzima lacasa se prepararon medios líquidos minerales a base de fibra 1 de maizoro y bagazo deshidratado de chayote en las proporciones 100%, 75%-25%, 50%-50% y 25%-75% respectivamente, se monitoreo la producción de lacasa en fermentación líquida a los 7, 14 y 21 días utilizando como sustrato al ABTS para el ensayo enzimático. La enzima con mayor actividad se aplicó

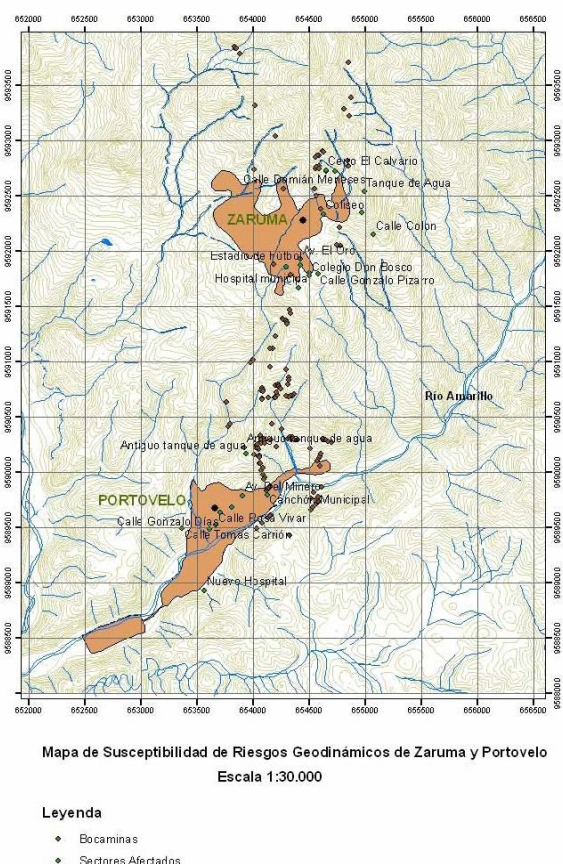
en aguas contaminadas con los colorantes azul cibacron y azul solofenil a 50 ppm así como a los compuestos aromáticos anilina y 2-clorofenol a 100 ppm, todas las determinaciones se realizaron por triplicado utilizando un espectrofotómetro Agilent 8453 UV-visible, también se monitoreo la cantidad de azúcares reductores formados. La enzima producida fue capaz de remover los colorantes estudiados y polimerizar compuestos aromáticos.

Como resultado de ello, este género demuestra tener oportunidades en diferentes áreas, sobretodo en la biorremediación por estar comprobada la eficacia en la biodegradación de algunos componentes químicos. Se escoge para la realización de este proyecto.

## 2. Materiales y Métodos.

### Localización del área de estudio

Los puntos de muestreo Serán seleccionados en base un red homogénea en forma de cuadrícula 100x100m diseñada sobre un mapa topográfico de la zona (Zaruma - Portovelo) Ajustándose algunos de los puntos en base a las cantidades de bocaminas existentes.



**Figura 1.** Ubicación Geográfica. Fuente: Pesantes, C; Carrión, P; Blanco R. Evaluación y Zonificación de Riesgos Geodinámicos en el Distrito Minero de Zaruma y Portovelo.

### 2.1. Obtención de las muestras de suelo.

En el lugar con equipo multiparametrico se midió los Parámetros abióticos: Temperatura (C°), Humedad relativa (%) y pH. Según el método PCA (Principal Component Analysis) se coloca para leer estos parámetros abióticos en ambiente.

La obtención de las muestras de suelo se realiza tomando 12 puntos. En cada uno de los puntos de muestreo se recogió muestras de suelo de aproximadamente de 2 kg. Son 12 muestras de suelo de cada área para tener suficiente muestra con 3 réplicas para cada metal estudiado. Luego el remanente se pulverizó con un mortero y se guardó en bolsas estériles.

### 2.2 Análisis químico

Para esto, se diluyen 20g de tierra en 20ml de agua estéril y se homogeniza; Se toman 2ml del homogenizado y se depositan en 10 cajas petri, estos se dividirán en 2 grupos: 5 en medio de cultivo SDA (Saboraud Dextrose Agar) y 5 en medio de cultivo MEA (Malt Extract Agar). Se incuban a 25°C, por una semana.

Se realizó la cuantificación de los metales pesados que se encuentran presentes en nuestra área de estudio. Por Metodología de Absorción Atómica se utilizaran estándares de 1000 mg L-1 (Merck) de cada elemento.

Fueron prioritarios, los metales más abundantes y con efectos nocivos para el ser humano: Cadmio (Cd), Cobalto (Cb), Cobre (Cu) y Plomo (Pb).

Para conocer los metales que presenta el suelo contaminado se realizó la extracción de metales, usando el horno (mufla) donde incineramos las muestras en crisoles, para eliminar humedad y toda contaminación orgánica a temperaturas desde los 600°C a 110°C. Estas muestras son pesadas antes y después de poner en el horno, se calculó su diferencia de peso. Esta diferencia es la humedad del suelo.

Incinerando nuevamente en el horno por 3 horas a 600°C para reducir la muestra a sólo lo inorgánico. Enfriadas las muestras, se transfirieron cuantitativamente a un vaso de precipitado de 600 ml. Se añadió 3 porciones de 1 ml (uno a la vez) de HCL Ácido clorhídrico concentrado y de ahí, el ácido con los residuos de la muestra se pasaron al vaso de precipitado que contenía la muestra de suelo correspondiente. Luego se le añadió 1 ml de Ácido

Nítrico (HNO<sub>3</sub>) al crisol y se pasó al vaso de precipitado. La misma acción se realiza con 3 porciones de 1ml de Ácido clorhídrico (HCL) al 10%.

Los vasos precipitados son calentados en un “hot plate” a temperatura moderada (~350 °C) por aproximadamente 15 min. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y nuevamente se le añadió las mismas porciones de los ácidos clorhídrico y nítrico, pero esta vez directamente a un beaker.

Este beaker se calentó nuevamente y se dejó enfriar, para luego ser filtrado. Durante la filtración se lavó el residuo con HCL 10 % hasta que quedó incoloro removiendo completamente todo el residuo. Terminada la filtración, por último, se transfirió a botellas plásticas debidamente rotuladas y con tapa para ser almacenadas hasta el momento de la lectura con el Espectrómetro de Absorción Atómica.

### **2.3 Comprobación, obtención y mantenimiento de Pleurotus.**

Antes de comenzar el tratamiento, se verifico que el suelo que se pretender biorremediar no contenga previamente el hongo Pleurotus Ostreatus. Para esto, se diluyó 20g de tierra en 20ml de agua estéril y se homogenizó; Se tomó 2ml del homogenizado y se depositó en 10 cajas petri, estos se dividieron en 2 grupos: 5 en medio de cultivo SDA (Sabouraud Dextrose Agar) y 5 en medio de cultivo MEA (Malt Extract Agar).

Para la preparación del inoculo el hongo liofilizado ATCC® Number: 32783™ Pleurotus Ostreatus (Jacquin: Fries) Kummer, teleomorph. Se transfirió a otros platos Petri con diferentes medios de cultivo: SDA y MEA para su multiplicación y mantenimiento; para ello, se preparó 5 cultivos en medio SDA y 5 cultivos en el medio MEA. Los cuales, se incubaran a 25 °C por un periodo de 7 días hasta que el micelio crezca y cubra el plato Petri completamente.

### **2.4 Tratamiento.**

En 12 tubos de ensayo se colocaron aproximadamente 1 g de muestra del suelo muestreado, 6 fueron seleccionados para el tratamiento y 6 para el control. La asignación del tratamiento fue al azar. Para los tubos que recibieron el tratamiento 2 fueron rotulados a tiempo inicial, 2 fueron rotulados 15 días y los 2 restantes 30 días. A los tubos seleccionados como tratamiento se les colocó un inóculo 5 ufc/ml del hongo Pleurotus, que corresponde a 1 cm de diámetro aproximadamente de área de los platos Petri con micelio obtenido de los medios SDA Posteriormente tratamiento y control fueron incubados a temperatura ambiente.

A los 15 y 30 días respectivamente se realizó una extracción y lectura de los metales pesados de los tubos inoculados para evaluar la capacidad de remoción de los metales pesados presentes en el suelo tratado, así mismo del grupo control. Para verificar la presencia del hongo Pleurotus se realizó previamente una extracción de la muestra del suelo sembrado, donde se inoculó con micropipeta el sobrenadante en medios SDA y MEA. Respectivamente que fueron incubados a temperatura ambiente y leídos 15 días posteriormente.

### **2.5 Análisis de datos.**

De los datos obtenidos del grupo control y del tratamiento se realizó una prueba Anova de dos vías en donde se midió el efecto del hongo a base del tiempo, del área y de la interacción tiempo-área.

También se realizó una prueba Tukey para determinar en dónde se encontraban las diferencias significativas con relación al tiempo-área y la interacción tiempo-área.

## **3. Resultados.**

- Los valores obtenidos al momento de recolección de la muestra de los parámetros de temperatura, humedad relativa y pH fueron los siguientes: Para la temperatura fue 30.8 °C; la humedad relativa fue 69.2 y el pH 8.4.
- Se evaluó la eficacia de remoción del hongo en relación con los diferentes metales pesados presentes en las muestras siendo más efectivo para la remoción del Co,Cd y en menor proporción para el Pb, Cu.
- La efecto de la relación tiempo-concentración no es directamente proporcional a la concentración de los metales ni a la concentración del inoculo.
- La concentración del inoculo fue solo eficiente para cierto tipo de metales pesados
- Los parámetros ambientales no afectan directamente a la fijación del hongo por los metales pesados.

## **4. Conclusión.**

- A través de este proyecto se presentará y se demostrará los beneficios de la biorremediación como método de limpieza de suelos contaminados por metales pesados y que es una alternativa viable con el hongo *Pleurotus Ostreatus*, que tiene la capacidad de remover los metales pesados.
- A partir de este estudio se da hincapié a la contaminación minera que existe en nuestro país y lo poco que ha sido cuidada, dando una opción económica para mejorar el ambiente que nos rodea y de la cual somos beneficiarios.
- Es importante considerar que el inóculo propuesto solo es capaz de trabajar sobre una determinada concentración de metales pesados, pero si esta se ve incrementada por más actividades humanas posiblemente sea una causa para el fallo del tratamiento
- La capacidad del hongo no depende directamente de las condiciones ambientales idóneas, ni de la concentración de los metales pesados, ni de la edad del hongo en sí, sino que este asuperdita a su concentración.

#### 14. Referencias.

- [1] Schmidt W. Informe Técnico. Suelos contaminados con hidrocarburos: la biorremediación como una solución ecológicamente compatible. Alemania
- [2] Aranibar, A. Villas-Basas, R. Pequeña Minería y Minería Artesana en Iberoamérica: Conflictos, Ordenamiento, soluciones. Rio de Janeiro: CETEM/CYTED/CONACYT. 2003
- [3] Vacacela E, Nuestra Solidaridad: MINERIA EN ECUADOR Y SU IMPACTO EN EL MEDIO AMBIENTE 2007 <http://www.arquidiocesisdecuenca.org.ec/index.php?name=News&file=article&sid=1239&theme=Printer>
- [4] Ministerio de Energía y Minas del Ecuador (1999) Monitoreo ambiental de las áreas mineras en el sur del Ecuador 1996-1998, PRODEMINCA. Quito.
- [5] Sherameti I, Varma A., Soil Biology: Soil Heavy Metals. New York, 2010.
- [6] Ingeniería Ambiental & Medio Ambiente. 2000 <http://www.fortunecity.es/expertos/profesor/171/suelo s.html>
- [7] Los metales como contaminantes, DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA AMBIENTAL Y SALUD PÚBLICA, UNIVERSIDAD DE HUELVA, España.
- [8] MICROORGANISMOS Y METALES PESADOS: UNA INTERACCIÓN EN BENEFICIO DEL MEDIO AMBIENTE Revista Química Viva Vol. 2, número 3, 2003 [quimicaviva@qb.fcen.uba.ar](mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar)
- [9] Castillo R. F, Biotecnología ambiental. Editorial Tébra, Madrid. 2005
- [10] Ramos G. *Pleurotus Ostreatus* Cultivado en residuos de palma aceitera como importante fuente proteica para la dieta humana. Tesis de Grado, Escuela superior politécnica del Chimborazo, facultad de ciencias químicas. 2007.
- [11] García Rollán M. Cultivo de setas y trufas. Madrid 2007
- [12] Frazar, C. 2000. Bioremediation and phytoremediation of pesticides contaminated sites. Prepair for US Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste and Emergency Response, Technology Innovation Office. Washington, DC. <http://www.clu-in.org>.
- [13] Novoyny, C., Rawal, B., Bhatt, M., Patel, M., Sasek, V., Molitoris, H. Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. Journal of Biotechnology, 2001.
- [14] Sullia, S., 2003. Fungal Diversity and Bioremediation: [http://fbae.org/2009/FBAE/website/special-topics\\_student\\_zone\\_fungal\\_diversity\\_and\\_bioremedi at.html](http://fbae.org/2009/FBAE/website/special-topics_student_zone_fungal_diversity_and_bioremedi at.html)
- [15] McCally M, Lif Support: The environment and Human Health. Massachusetts Institute of Tecnology 2002
- [16] Materiales y Métodos: [http://caterina.udlap.mx/u\\_dl\\_a/tales/documentos/laec/flores\\_1\\_b/capitulo5.pdf](http://caterina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/laec/flores_1_b/capitulo5.pdf)
- [17] Mendez-Vilas A. Current Research Tonics in applied Microbiology and microbial Biotecnology. Singapore, 2009
- [18] Waldick L. ESTUDIO DE CASO: ECUADOR (MINERIA) Minería, Contaminación y Salud en Ecuador. IDRC. [http://www.idrc.ca/lacro/ev-29139-201-1-DO\\_TOPIC.html](http://www.idrc.ca/lacro/ev-29139-201-1-DO_TOPIC.html) 2004
- [19] Zúñiga, F. Introducción al Estudio de la contaminación del Suelo por Metales Pesados. México: Universidad Autónoma de Yucatán. 1999.
- [20] Diez, J. Fitocorrección de Suelos contaminados con metales pesados: Evaluacion de plantas tolerantes y optimización del proceso mediante prácticas agronomicas. 2000.
- [21] Sandoval, F. La Pequeña Minería en el Ecuador. 2001.
- [22] [http://www.ucm.es/info/crismine/Geologia\\_Minias/Mineria\\_toxicidad.htm](http://www.ucm.es/info/crismine/Geologia_Minias/Mineria_toxicidad.htm) (Minerales, Metales, Compuestos Químicos, y Seres Vivos: Una Difícil Pero Inevitable Convivencia R. Oyarzun & P. Higuera)

