



ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DEL LITORAL

**FACULTAD DE INGENIERÍA MARÍTIMA, CIENCIAS BIOLÓGICAS,
OCEÁNICAS Y RECURSOS NATURALES**

PROYECTO DE MATERIA DE GRADUACIÓN

**“APLICACIÓN DEL HONGO *Pleurotus ostreatus* COMO
ALTERNATIVA PARA LA BIORREMEDIACION DE SUELOS
CONTAMINADOS CON METALES PESADOS”**

Previa a la obtención del Título de:

BIÓLOGO

Presentada por:

Coello Paredes Jessica Marisol

Guayaquil - Ecuador

2011

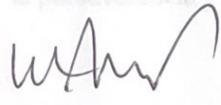
DECLARATORIA

MIEMBROS DEL TRIBUNAL

Conforman el Tribunal los siguientes miembros

A mis padres Eduardo y Marcela, por su comprensión en los momentos malos. Me han enseñado a enfrentar las adversidades sin perder la dignidad. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores y mis principios.

A mi abuelita Filomena Valdivezo por quererme tanto y tan bien. Me enseñó la perseverancia y el empeño, me mostró que la edad no es un impedimento para trabajar.

 <hr/> Marcos Alvarez, Biol.	 <hr/> Francisca Burgos, Msc
Docente de la FIMCM	Directora de Tesis

A la MSc. Francisca Burgos, por su apoyo incondicional en la elaboración del Proyecto de Tesis de la Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar. Sus consejos que me han brindado desde el inicio de la carrera.

DEDICATORIA

A mis padres Eduardo y Marisol, por su comprensión en los momentos malos. Me han enseñado a encarar las adversidades sin perder la dignidad. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores y mis principios.

A mi abuelita Filomena Valdiviezo por quererme tanto y tan bien. Me enseñó la perseverancia y el empeño, me mostró que la edad no es un impedimento para trabajar.

A la M.Sc Francisca Burgos, por su apoyo incondicional en la elaboración del Proyecto.

Al M.Sc Marcos Álvarez y a la Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar, por el apoyo que me han brindado desde el inicio de la carrera.

*“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un
esfuerzo total es una victoria completa”*

Mahatma Gandhi

Declaración Expresa

- 1 ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN 1
- 2 MARCO TEORICO..... 28
 - 2.1 GENERALIDADES..... 8
 - 2.2 Conceptos de estudio por el tema de estudio..... 28
 - 2.3 Tipos de la investigación en estudio..... 28

“La responsabilidad del contenido de este Trabajo Final de Graduación nos corresponde exclusivamente, y el patrimonio intelectual de la misma a la Escuela Superior Politécnica del Litoral”

- 2.4 Tipos de Métodos..... 28
 - 2.4.1 Clasificación..... 28
 - 2.4.2 Plurimetodología..... 28

Integrantes: OS

- 3.1 Objetivo General
- 3.2 Objetivos Específicos

4 PRINCIPALES IMPACTOS

- 4.1 Impactos Científicos
- 4.2 Impactos Sociales
- 4.3 Impactos Económicos

5 RECURSOS Y METODOS Jessica Coello

- 5.1 RECURSOS
 - 5.1.1 Eválgico **Jessica Coello Paredes**
 - 5.1.2 Humanos
 - 5.1.3 Técnicos

5.2 AREA DE ESTUDIO

- 5.2.1 Situación General
- 5.2.2 Situación Particular

INDICE GENERAL

1	ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION:.....	2
2	MARCO TEORICO	8
2.1	GENERALIDADES.....	8
2.2	Contaminación de suelos por metales pesados [6]:.....	10
2.3	Efectos de la contaminación por Metales Pesados [7]:	12
2.3.1	Los metales y metaloides pueden generar estrés oxidativo.	13
2.3.2	Los metales y metaloides contaminantes compiten con metales esenciales.....	13
2.4	Bioremediación de Metales Pesados:.....	14
2.5	Género Pleurotus:	17
2.5.1	Clasificación [11]:	19
2.5.2	Pleurotus ostreatus como biorremediador:	20
3	OBJETIVOS	23
3.1	Objetivo General:	23
3.2	Objetivos Específicos:	23
4	PRINCIPALES IMPACTOS	24
4.1	Impactos Científicos.....	24
4.2	Impactos Sociales	25
4.3	Impactos Ambientales	25
5	RECURSOS Y METODOS.....	26
5.1	RECURSOS:.....	26
5.1.1	Biológico:	26
5.1.2	Humanos:	26
5.1.3	Técnicos:	26
5.2	AREA DE ESTUDIO:.....	27
5.2.1	Situación Geográfica:	27
5.2.2	Situación Política:.....	27

5.3	MATERIALES Y MÉTODOS:	29
5.3.1	Obtención de las muestras de suelo.....	29
5.3.2	Análisis químico de las muestras.	30
5.3.3	Extracción de metales [16].	30
5.3.4	Comprobación, obtención y mantenimiento de Pleurotus.	33
5.3.5	Preparación del inóculo.....	33
5.3.6	Tratamiento:	34
5.3.7	Análisis de datos	35
6	RESULTADOS ESPERADOS:	39
7	CONCLUSIÓN:.....	40
8	BIBLIOGRAFIA.....	41
9	ANEXOS.....	44
9.1	Cuadro 1: Los Metales pesados más importantes sus densidades, abundancia y su categoría como esenciales y/o contaminantes.	44
9.2	Cuadro 2: Los principales impactos ambientales de la minería aurífera a pequeña escala en el Ecuador.	47
	Fuente: Sandoval, La Pequeña Minería en el Ecuador. 2001	48
9.3	Cuadro 3: Costo de Materiales.	48
9.4	Cuadro 4. Costo de la Cepa Hongo Pleurotus Ostreatus.....	49
9.5	Cuadro 5. Costo de recursos bibliográficos.	49

INDICE DE TABLAS

5.4	Actividades y sus Costos:.....	36
5.5	Distribución del presupuesto:	37
5.6	Cronograma:	38

CAPITULO I

1 ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION:

Los contaminantes como metales pesados (Cd, Hg, Pb, Cu, Ni, Sb, Bi) tienen la capacidad de provocar cambios evolutivos debido a sus efectos dañinos. Son potencialmente contaminantes devastadores ya que contaminan el aire, el agua y la tierra.

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. Entre las más severas contaminaciones destacan las que se produjeron y todavía se producen por Metales Pesados porque tienden a bioacumularse. La bioacumulación significa un aumento en la concentración de un producto químico en un organismo biológico en un cierto plazo, comparada a la concentración del producto químico en el ambiente. [1].

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

vida y el ambiente; desplazan comunidades, se apropian de extensos territorios, de las aguas, de la biodiversidad y desequilibran la seguridad y soberanía alimentaria de las poblaciones afectadas.

La minería en pequeña escala, por ejemplo, también ha tenido graves implicaciones medioambientales debido a las condiciones de pobreza en que, paradójicamente, vive la gente que se dedica a esta actividad laboral. Además, la falta de infraestructura sanitaria junto con el bajo nivel tecnológico, ha sido fuente del deterioro del medio ambiente local; así mismo como consecuencia de lo anterior un alto índice de enfermedades debido a la toxicidad de los procesos metalúrgicos de extracción [2].

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 [3].

De acuerdo a los resultados del monitoreo ambiental realizado en varios distritos de minería aurífera en el país, caracterizados por la intensidad de las labores mineras a pequeña escala, durante 1996 y 1998, se concluye que:

“La minería de oro en el sur del Ecuador ha causado considerables impactos ambientales, siendo los más severos los de las áreas Portovelo-Zaruma y Ponce Enríquez. Los principales contaminantes son cianuro, metales pesados y mercurio. Las fuentes más significativas de estos contaminantes son las colas descargadas directa o indirectamente en los ríos, por los sistemas de disposición inadecuados. La descarga de estos contaminantes ha provocado la extinción de toda forma de vida superior en ciertos tramos del ríos; además, en varios lugares, la mala calidad del agua imposibilita su uso como agua potable, para irrigación o criaderos acuáticos” [4].

La Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los Estados Unidos ha determinado una serie de límites para las concentraciones de metales pesados. Por encima de éstos los metales pueden causar graves trastornos en los seres vivos, y finalmente ocasionar la muerte.

Es en base a este mal manejo que aumenta la demanda por buscar maneras de conservar limpias las áreas naturales, aquellas que han sido contaminadas por las acciones del hombre.

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 propios del entorno que permiten disminuir por

medio de sus procesos bioquímicos la presencia de dichos metales pesados. 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).

El cultivo del hongo ***Pleurotus Ostreatus*** presenta varias ventajas:

- Sus principales substratos de crecimiento son residuos vegetales ricos en ligninas (lignívoros) como maderas, cáscaras y pajas de cereales. Lo cual permite utilizar un residuo muy barato y fácil de conseguir.
- Es un gran colonizador capaz de desplazar otros organismos, lo cual requiere menos energía para eliminar probables contaminantes
- Por crecer en materiales ricos en lignina y celulosas, enfrenta pocos competidores que puedan prosperar sobre el mismo sustrato.
- Su crecimiento es rápido, produciendo un rendimiento promedio de 20% del peso del sustrato que lo contiene.
- La consistencia del carpóforo (campallapa o sombrero del hongo) es mayor a la mayoría de los otros hongos comestibles, por lo que su vida de post-cosecha es más prolongada.
- Por ser un producto menos cultivado que el champiñón, su precio es mayor en el mercado nacional e internacional.

- Representa la forma más eficiente de conversión de desechos vegetales en alimento.
- El alimento obtenido es considerado una comida agradable debido a su textura y sabor.
- El residuo producido puede ser utilizado de numerosas formas tales como producción de biogás, producción de papel o cartón, mejoradores de suelo, lombricultura, etc.
- Representa un papel vital en la ecología del ciclo de Carbono en la Naturaleza, reduciendo la acumulación de materia orgánica vegetal.
- Facilidad de adaptación del hongo a diferentes condiciones ambientales.
- Desarrollo del cultivo a menores costos en diferentes regiones geográficas, debido a que se pueden utilizar cepas que resultan adecuadas para las diversas temperaturas reinantes en dichas regiones siempre que estas sean más o menos constantes.

La biorremediación usando hongos blancos de putrefacción es una tecnología muy prometedora la cual está siendo estudiada (Frazar, 2000). 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.

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.

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.

CAPITULO II:

2 MARCO TEORICO

2.1 GENERALIDADES

Los metales pesados son metales de masa atómica elevada por lo general del quinto o sexto período de la tabla periódica. Los metales son notables por su amplia gama de usos, su dispersión, su tendencia a acumularse en algunos tejidos del cuerpo humano y su potencial de ser tóxicos aun a niveles de exposición relativamente bajos (Howard Hu, 2002).

Algunos metales como cobre y hierro son esenciales para la vida y juegan un papel importante en, por ejemplo, el funcionamiento de algunos sistemas enzimáticos. Otros metales son xenobióticos, es decir, no tienen ningún uso en los procesos fisiológicos y, como en el caso de plomo y mercurio, pueden ser tóxicos en cantidades imperceptibles. Aún los metales esenciales para el cuerpo humano, tienen el potencial de volverse dañinos si la persona es expuesta a altos niveles. [5]

El “U.S. Agency for Toxic Substances and Disease Registry” (ATSDR) enumera todos los peligros y daños presentes en desechos tóxicos de acuerdo a la severidad de su toxicidad. Según esta lista, en primer, segundo, tercer y sexto lugar se encuentran los siguientes metales pesados: Plomo, Mercurio, Arsénico y Cadmio, respectivamente.

La exposición a metales puede ocurrir a través de una variedad de rutas. Pueden ser inhalados como polvo o humo (por ejemplo, partículas de óxido de plomo en la combustión de gasolina con plomo); otros pueden ser evaporados y por consiguiente inhalados (mercurio en la producción de lámparas fluorescentes). Los metales también pueden ser ingeridos involuntariamente a través de comida o bebida. La cantidad que puede ser absorbida por el tracto digestivo depende de la forma o configuración química, la edad y el estado de nutrición de la persona (J. Ton et al., 2000).

El plomo en el suelo tiende a concentrarse en vegetales con raíz como la cebolla y será absorbido en mayor cantidad en individuos cuyas dietas son deficientes en calcio, hierro o zinc. La exposición a plomo puede desarrollar problemas de salud como convulsiones, coma, fallo renal y hasta la muerte dependiendo de la dosis. Los niños y los fetos aparecen particularmente vulnerables a efectos neurotóxicos por causa del plomo.

Estudios han demostrado que mujeres embarazadas que tienen plomo almacenado en sus huesos muestran un movimiento acelerado de éste al torrente sanguíneo y a la leche materna lo cual está asociado a nacimientos de bebés con bajo peso y decrecimiento en la razón de crecimiento y del desarrollo mental (Michael McCally, 2002).

Por su parte, la contaminación por cadmio también tiene sus efectos adversos en el cuerpo humano. La contaminación del terreno con cadmio puede ocurrir a través de emisiones de los desechos tóxicos de las industrias. Las implicaciones a la salud comienzan por la inhabilidad del ser humano de excretar el cadmio (es desechado al sistema excretor, pero reabsorbido por los riñones). Algunos de los efectos al cuerpo son irritación de las vías respiratorias, degeneración de los testículos, daño al túbulo proximal del nefrón (permitiendo que moléculas esenciales como calcio se filtren a la orina), pérdida de densidad en los huesos y cáncer en la próstata (Howard Hu, 2002).

2.2 Contaminación de suelos por metales pesados [6]:

Las sustancias descargadas por la minería entran en un proceso de reciclaje ambiental, dominado por la dinámica del ambiente receptor, y en algún momento tendrán que llegar obligatoriamente a los suelos, donde

tenderán a ser acumulados. Si la descarga persiste el tiempo suficiente, se podrían exceder los umbrales de seguridad ambiental.

Los elementos metálicos emitidos son llamados metales pesados, que son todos aquellos con densidad igual o mayor a 5g/cc. El concepto abarca 60 elementos, de casi todos los grupos del sistema periódico, muy diversos y algunos de síntesis artificial; sin embargo, excluye elementos no metálicos y/o de densidad menor, como el selenio, molibdeno y arsénico, que son contaminantes, tóxicos tales como elementos traza o microelementos, a pesar de no tener especificidad química, por lo menos restringen el grupo a elementos de síntesis natural en la litosfera en baja concentración.

Independiente del término empleado, lo importante es que 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. Para un ambiente dado, el impacto de esta contaminación, medido por la magnitud e irreversibilidad de los daños, extensión de superficie afectada e instantaneidad de emergencia, es función del elemento y del estilo de descarga.

2.3 Efectos de la contaminación por Metales Pesados [7]:

El término de metal pesado refiere a cualquier elemento químico metálico que tenga una relativa alta densidad y sea tóxico o venenoso en concentraciones bajas. Los ejemplos de metales pesados incluyen el mercurio (Hg), cadmio (Cd) el arsénico (As), el cromo (Cr), el talio (Tl), y el plomo (Pb). Los metales pesados son componentes naturales de la corteza de tierra. No pueden ser degradados o ser destruidos. En un grado pequeño se incorpora a nuestros cuerpos vía el alimento, el agua potable y el aire. 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 metal pesado podría resultar, por ejemplo, de la contaminación del agua potable (Tuberías del plomo), las altas concentraciones en el aire cerca de fuentes de la emisión, o producto vía la cadena de alimento.

Los metales pesados pueden entrar un abastecimiento de agua por medio de residuos industriales y de deposita corrientes, los lagos, los ríos, etc.

2.3.1 Los metales y metaloides pueden generar estrés oxidativo.

El metal interactúa con Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) por medio de la reacción de Fenton dando como resultado la generación de radicales altamente reactivos del oxhidrilo ($OH\cdot$), estos radicales son altamente oxidantes, provocando:

- Daños en lípidos de membrana
- Daños en proteínas
- Daños en ácidos nucleídos
- En general: daños metabólicos en el organismo, que pueden conducirlo a la muerte.
- Estos efectos pueden ser premutagénico.

2.3.2 Los metales y metaloides contaminantes compiten con metales esenciales

- Compiten por los sistemas de transporte, disminuyendo la concentración efectiva del metal esencial
- Activan receptores de membrana desencadenando reacciones en cadena.
- Reemplazan a metales esenciales en biomoléculas, alterando su funcionamiento.

- Reaccionan con grupos funcionales de biomoléculas, alterando su funcionamiento.

2.4 Bioremediación de Metales Pesados:

Las actividades industriales generan una contaminación a gran escala con metales pesados y radionuclidos en el medio ambiente. En el caso particular de los suelos, suelen afectar la fertilidad y/o el uso posterior de los mismos, mientras que en el caso de los acuíferos y aguas superficiales, pueden comprometer seriamente el uso de este recurso como fuente de agua para el consumo humano [8].

La remediación de estos ambientes contaminados mediante la utilización de métodos químicos involucra procesos de costos excesivamente altos debido a la especificidad requerida. Además, este tipo de solución no es aplicable en procesos de remediación in situ, ya que es imposible tratar un metal determinado debido a la competencia existente por la presencia de otros. La aplicación de métodos de remediación efectivos depende del conocimiento de los factores hidrológicos y geológicos del sitio, la solubilidad y especiación de los metales pesados, los procesos de atenuación e inmovilización y la medida en que los metales puedan dispersarse tanto horizontal como verticalmente a medida que migran por el suelo. Por otra parte, la utilización de métodos biológicos para remediar un ambiente contaminado

(biorremediación) ofrece una alta especificidad en la remoción del metal de interés con flexibilidad operacional, tanto en sistemas in situ como ex-situ.

La creciente demanda por buscar maneras de conservar limpias las áreas naturales y/o restablecer a su estado original aquellas que han sido contaminadas por las acciones de progreso del hombre [9]. La biorremediación es una técnica que utiliza organismos biológicos para remediar, restablecer o devolver un suelo, agua o aire a un estado limpio, libre de contaminantes o, al menos disminuir la concentración de contaminantes a niveles no tóxicos. Esta investigación busca una manera de aplicar la biorremediación para “limpiar” un suelo que contenga metales pesados [9]. La biorremediación es una tecnología de control de contaminación que utiliza sistemas biológicos para catalizar la degradación o transformación de compuestos tóxicos a formas menos dañinas. Uno de los objetivos del uso de la biorremediación es aumentar y mejorar la biodegradación por los organismos nativos (micro flora), lo que se conoce como biorremediación intrínseca, o por medio de la adición de organismos (bioaugmentation) para llevar a cabo un cambio en ese ambiente [6].

Se debe hacer un buen estudio del área a ser limpiada antes de tomar la decisión de cuál método utilizar para la remoción del contaminante. Se deben tomar en cuenta los contaminantes presentes en el lugar, el medio ambiente

en el que existen (suelo o agua, accesibilidad) y la extensión del área contaminada. Los contaminantes pueden variar grandemente en un mismo lugar especialmente si se trata de un área donde hay o hubo una facilidad de manufactura donde se pueden encontrar productos finales, intermedios y primarios.

Los contaminantes se pueden encontrar en el suelo, sedimentos, agua subterránea o agua superficial. Lo ideal es que el tratamiento destruya o remueva los contaminantes sin crear productos intermedios. Algunas tecnologías sólo son capaces de relocalizar o estabilizar el contaminante. Todos los métodos de control de contaminación disponibles tienen sus ventajas y limitaciones; es deber del encargado del proyecto estudiar la opción que mejor le aplique. Al tomar todos los factores en consideración, la biorremediación no es la mejor opción para algunos casos.

La biorremediación usando hongos blancos de putrefacción es una tecnología muy prometedora la cual está siendo estudiada. Muchos estudios se enfocan en la habilidad que tienen con la degradación de compuestos persistentes, principalmente los de la familia *Phanerochaete* donde se encuentra el hongo ***Pleurotus Ostreatus***. Estos 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.

2.5 Género Pleurotus:

Las setas del género Pleurotus son saprófitas y por lo tanto se alimentan de materiales orgánicos muertos. Este género tiene un alto reconocimiento debido a su contenido proteínico. En comparación con los vegetales y la carne.

Se trata de una seta bastante variable. Su sombrerillo o parte superior tienen un tamaño que depende de la edad y de las condiciones más o menos favorables en que ha crecido el hongo, oscilando entre los 5 y 20 cm. de diámetro, aunque pueden encontrarse ejemplares más grandes. La forma también depende de la edad, pues al principio es redondeada y abombada, pero luego, a medida que se va abriendo y ensanchando el sombrero, se hace cada vez menos convexa y se aplana. Después el borde se va levantando y el conjunto acaba teniendo concavidad como un plato [10].

La superficie es lisa y generalmente uniforme. En cuanto al color puede variar desde el gris claro al gris oscuro de tono violáceo o azulado, y desde color café con la leche a pardo. Las variedades que crecen en la época fría

son más grisáceas y oscuras, mientras que la de meses templados son ásparduscas y claras. Algunas variedades pueden presentar tonos verdosos o azul-verdosos muy llamativos. En general, con el paso del tiempo o después de lluvias muy intensas el color va palideciendo en todas las variedades y acaba tomando tonos amarillentos sucios.

Si damos la vuelta al sombrero de la seta podemos ver que en la parte inferior tiene laminillas dispuestas radialmente, que va desde el pie o tallo que lo sostiene hasta el borde del sombrero. Están separadas unas de otras (aunque algunas pueden estar bifurcadas) y son de color blanco o ligeramente crema. En ellas se producen las esporas destinadas a la reproducción de la especie [10].

Las esporas, vistas al microscopio, son alargadas, casi cilíndricas y miden 7 a 11.5 x 3 a 5,6 micras. Cuando se depositan en masa forman un polvillo harinoso de color blanco con tono lila-grisáceo.

El pie de la seta suele ser corto, ligeramente duro, blanco, con el principio de las laminillas en la parte de arriba y algo peloso en la base. Su aserción del hongo. Si crecen varios juntos, que suele ser lo más frecuente, formando repisas laterales superpuestas sobre un costado de los árboles o de los

bloques de cultivo, los pies están unidos unos a otros, son cortos y están cerca de un lado del borde de los sombreros, que suelen tener forma de abanico o riñón. Pero si crecen aislados, sobre una superficie horizontal, o si hay demasiada humedad, el pie puede ser largo, central y el sombrero circular. La carne del sombrero es blanca, el olor algo fuerte, tierna al principio y después correosa. La piel es mucho más consistente, pero también blanca [10].

Es una especie que se suele encontrar en los bosques, en sitios húmedos. Prefiere la base de los troncos de árboles de hoja ancha (frondosas), pero también crecen sobre árboles de otras especies, incluso sobre arbustos como las retamas.

2.5.1 Clasificación [11]:

Pleurotus Ostreatus

Reino: Fungi

Subreino: Fungi superior

División: Basidiomycota

Superclase: Holobasidiomycia

Clase: Hymenomycetes

Orden: Agaricales

Familia: Tricholomataceae

Género: Pleurotus

Especie: Pleurotus ostreatus

2.5.2 Pleurotus ostreatus como biorremediador:

Muchos 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 llamada Lacasa, esta cataliza una reacción que degrada lignina, un compuesto aromático. Para catalizar estas reacciones poderosas la enzima requiere peróxido de hidrógeno, la cual el hongo produce [12].

En adición a la descomposición de lignina, el potencial de los hongos blancos de putrefacción (white-rot fungi en inglés) para la descomposición de varios contaminantes en suelos estériles y no estériles está siendo bien documentada [13]. De hecho, se consideran muy prometedores en su

aplicación como biorremediadores de suelos contaminados. Muchas de las tecnologías para remediación de suelos contaminados incluyen no solo tratamientos físicos y químicos, pero también biorremediación de contaminantes por actividad microbiana. Los hongos tienen muchas ventajas que facilitan el estudio de su uso en la biorremediación, por ejemplo: los hongos están presentes en sedimentos acuáticos y en hábitats terrestres, además poseen ventaja sobre las bacterias por el hecho de que sus hifas pueden penetrar el suelo contaminado y producir enzimas extracelulares que degradan los contaminantes. Los hongos son además, muy buenos en la acumulación de metales pesados como cadmio, cobre, mercurio, plomo y zinc [14].

Los hongos de pudrición blanca poseen un sistema enzimático extracelular de carácter no específico, capaz de romper una gran cantidad de enlaces diferentes y, por lo tanto, de degradar una gran variedad de compuestos orgánicos. ***Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* y *Pleurotus spp.*** Son los hongos que se han identificado con mayores potencialidades para ser empleados con estos fines. Dentro de las enzimas constituyentes del complejo multienzimático ligninolítico de *Pleurotus spp.* se encuentra la lacasa (p-difenol:dioxígeno:oxido-reductasa, EC 1.10.3.2). Las enzimas lacasas catalizan la oxidación, polimerización, depolimerización, metilación y/o dimetilación de compuestos fenólicos. Estas enzimas tienen un

uso potencial en diversos procesos de biorremediación como el tratamiento de efluentes de fábricas de pulpa de papel, de textiles o de otras que contienen cloroligninas o compuestos fenólicos. Las lacasas se han encontrado en hongos de pudrición blanca, en otros hongos, insectos, plantas y bacterias. ***Pleurotus ostreatus*** es un hongo de pudrición blanca. Ha sido reportado que la actividad de lacasas depende del organismo y de las condiciones de desarrollo. Esta enzima ha sido empleada de forma inmovilizada para remover compuestos xenobióticos de residuos acuosos, la detoxificación de compuestos fenólicos en vinos y en la obtención de hidrolizados de lignocelulosa antes de ser usados para la fermentación alcohólica, encontrándose la participación de esta enzima en la decoloración de melazas y colorantes.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo General:

- Comprobar la eficacia como biorremediador del hongo *Pleurotus Ostreatus* en suelos contaminados por metales pesados.

3.2 Objetivos Específicos:

- Estudiar las concentraciones de los residuos, según relación-tiempo, después de aplicar el hongo *Pleurotus Ostreatus*.
- Estudiar la absorción del hongo *Pleurotus Ostreatus* para cada metal pesado estudiado.

4 PRINCIPALES IMPACTOS

4.1 Impactos Científicos

Mostrar a la biotecnología como una herramienta sencilla, para poder ayudar al medio ambiente, en una forma más natural, sin afectar más el medio. Una técnica pueda ser empleada y si es posible mejorarla. Dar más estudios, ir más allá de un hongo, o buscar otros organismos que beneficien esta técnica.

La aplicación de una alternativa de remediar los impactos ambientales producto de las acciones de actividades de explotación minera con ayuda de agentes biológicos propios del entorno disminuyendo las probabilidades de contaminación cruzada y efectos secundarios adversos por utilizar microorganismos del entorno que permitan la fijación de los residuales de metales pesados sino además ayudar a la degradación de materia orgánica del entorno.

4.2 Impactos Sociales

A partir de este proyecto la comunidad se beneficiará de una manera más económicas, por biorremediación se evitarían más enfermedades que el hombre contrae por usar estos suelos para la agricultura, el agua que bebe o de los animales que conviven ahí y son consumidos, por ende los costos de salud pública reducirían, así mismo, las condiciones de los suelos para agricultura mejorarían.

4.3 Impactos Ambientales

Tal vez la biorremediación no es inmediata, ya que toma su tiempo, sin embargo lo interesante de ingresar un hongo es que por las condiciones y características de supervivencia del mismo será capaz de realizar colonizaciones primarias y secundaria permitiendo ser un tratamiento perenne en el tiempo. Disminuyendo la proporción de metales pesados, producto de la actividad humana.

5 RECURSOS Y METODOS

5.1 RECURSOS:

5.1.1 Biológico:

Hongo congelado ATCC® Number: 32783™ *Pleurotus ostreatus* (Jacquin: Fries) Kummer, teleomorph.

5.1.2 Humanos:

- Laboratoristas
- Biólogos
- Micólogos

5.1.3 Técnicos:

- Laboratorio de Microbiología de la FIMCBOR.

5.2 AREA DE ESTUDIO:

5.2.1 Situación Geográfica:

CANTON: Zaruma

CANTON: Portovelo

SUPERFICIE: 643.5 Km²

SUPERFICIE: 286.2 Km²

POBLACION: 25.000

POBLACION: 15.000 Habitantes

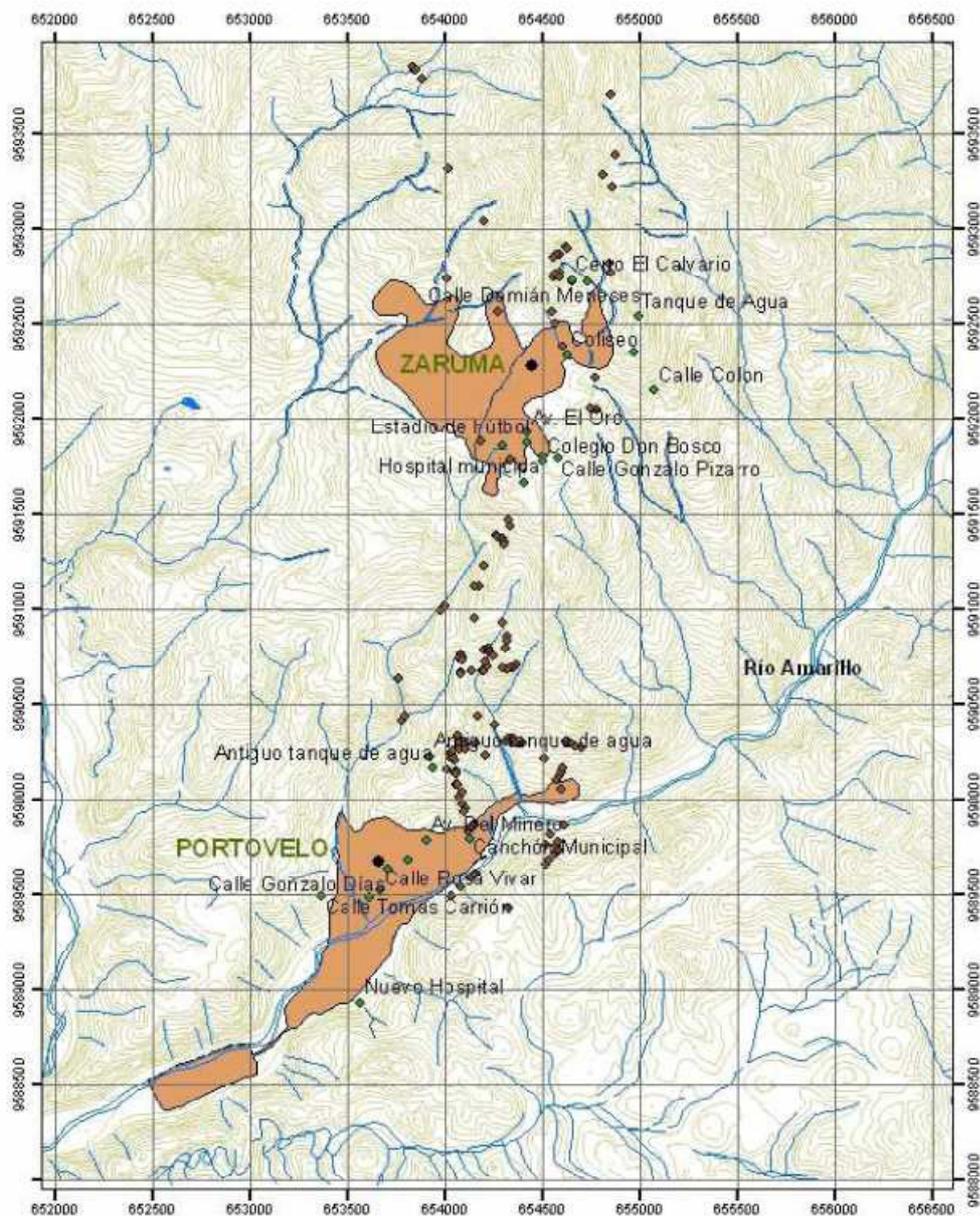
DENSIDAD POBLACIONAL: 38.85
Hab/Km²

DENSIDAD POBLACIONAL: 52.41
Hab/Km²

5.2.2 Situación Política:

Zaruma: El cantón Zaruma está ubicado en la parte sur-oriental de la Provincia de El Oro. Se encuentra a una altitud de 1.200 metros sobre el nivel del mar.

Portovelo: El cantón Portovelo está situado al Sur Este de la Provincia de El Oro, en pleno límite con la Provincia de Loja separada de la misma con el río Pindo y Ambocas. Limita al norte con el cantón Zaruma, al sureste con la Provincia de Loja y al oeste con el cantón Piñas. Se encuentra a una altura de 640 metros sobre el nivel del mar.



Mapa de Susceptibilidad de Riesgos Geodinámicos de Zaruma y Portovelo
Escala 1:30.000

Leyenda

- ◆ Bocaminas
- Sectores Afectados

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

5.3 MATERIALES Y MÉTODOS:

Los puntos de muestreo serán seleccionados en base de una 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.

5.3.1 Obtención de las muestras de suelo.

Se tomó 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. Se removió los escombros (ramitas, piedras y hierba), en el laboratorio. Luego el remanente se pulverizó con un mortero y se guardó en bolsas estériles. Para coleccionar la muestra se utilizo cucharas y bolsas plásticas, ambas estériles para no alterar la composición de microorganismos del lugar.

En el lugar con equipo multiparametrico se midió los Parámetros abióticos: Temperatura (C°), Humedad relativa (%) y pH.

5.3.2 Análisis químico de las muestras.

Se realizó la cuantificación de los metales pesados que se encuentran presentes en nuestra área de estudio. Por Espectrofotometría de Absorción Atómica se utilizaron 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) (Tabla 1). [15]

5.3.3 Extracción de metales [16].

Para la extracción de los metales de la muestra de suelo se debe seguir el siguiente protocolo:

Primero se incineró los crisoles en el horno (mufla) durante 2 hrs. a 600 °C para eliminar la humedad y toda contaminación orgánica y se deja enfriar dentro del desecador para evitar que reabsorba humedad.

A cada uno se le añadió 1g de tierra, se anotó el peso de la muestra junto con el crisol (P1) y se colocó en el horno durante 18-20 hrs. a 110 °C con lo que se le remueve la humedad de la muestra.

Nuevamente se pesó (P2) y se calculó la diferencia entre el peso antes de colocarlos en el horno (P1) y después de las 18-20 hrs. en el horno (P2); esta diferencia era la humedad del suelo.

$$\text{Hs (Humedad del suelo)} = [P1] - [P2]$$

Luego los crisoles con la muestra se colocaron nuevamente en el horno (mufla) por 3 hrs. a 600 °C para reducir la muestra a sólo lo inorgánico, se removió y se dejó enfriar en el desecador.

Inmediatamente enfriados, las muestras de suelo en cada crisol 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_3) al crisol y se pasó al vaso de precipitado. La misma acción se realiza con 3 porciones de 1 ml de Ácido clorhídrico (HCL) al 10%.

Se utilizaron cristales de reloj para tapar los vasos de precipitado los cuales se calentaron en un "hot plate" a temperatura moderada (~ 350 °C) por aproximadamente 15 min. Se dejó enfriar a temperatura de salón y nuevamente se le añadió las mismas porciones de los ácidos clorhídrico y nítrico, pero esta vez directamente al beaker con la muestra, en vez de al crisol.

Se calentó nuevamente en el "hot plate", se dejó reposar para que se enfriaran y todo el contenido del beaker se filtró. Para la filtración se usó papel de filtro # 40 y matraces volumétricos de 100 ml.

Durante el proceso de filtración se lavó el residuo con HCL 10 % hasta que quedó incoloro. El papel de filtro también se enjuagó varias veces con HCL 10% hasta que se removió completamente todo el residuo. Terminada la filtración el matraz volumétrico se llevó a volumen con HCL 10%. Por último, el filtrado 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.

5.3.4 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 (Saboraud Dextrose Agar) y 5 en medio de cultivo MEA (Malt Extract Agar). Posteriormente Se incubaron a 25°C, por una semana. Se observa si no hay crecimiento del hongo en las cajas Petri. Esto dará la aprobación de que este suelo puede ser tratado, ya que luego se aplicará este hongo.

5.3.5 Preparación del inóculo

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. Este proceso se llevo a cabo cada dos semanas después del crecimiento total del micelio.

5.3.6 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 (5.4.2), donde se inoculó con micropipeta el sobrenadante en medios SDA y MEA. Respectivamente que fueron incubados a temperatura ambiente y leídos 15 días posteriormente.

5.3.7 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.

5.4 Actividades y sus Costos: Tabla 3

N	Actividad	Fecha Inicio	Fecha Fin	Recursos Materiales	Recursos Humanos	Costo de la actividad
1	Búsqueda y Selección de Metodología	16/05/2010	11/06/2010		Estudiantes a cargo del proyecto	\$900.00
2	Muestreo y Traslado	14/06/2010	17/06/2010		Estudiantes a cargo del proyecto	\$510,00
3	Recursos Humanos	18/06/2010	21/06/2010		Estudiantes a cargo del proyecto	\$4.000,00
4	Materiales de Laboratorio	21/06/2010	22/06/2010		Estudiantes a cargo del proyecto	\$13.669,60
5	Consumos Básicos (Agua, luz, teléfono)	23/06/2010	25/06/2010		Estudiantes a cargo del proyecto	\$1.063,56
6	Estudio de efectividad	28/06/2010	15/07/2010		Estudiantes a cargo del proyecto	\$3.201,02
7	Realización del informe	19/07/2010	23/09/2010		Estudiantes a cargo del proyecto	\$3.000,00
COSTO TOTAL PROYECTO						\$26.344,18

5.5 Distribución del presupuesto: Tabla 4

		Aporte CICYT (US\$)	Otros Aportes Institucionales (US\$)	Aporte Externo (US\$)	Total (US\$)
1	Viajes Técnicos			110,00	110,00
2	Capacitación (<i>pasantías, cursos</i>)				
3	Equipos ($\leq 50\%$)		10.678	150,00	10.828,00
4	Libros y Revistas			350,00	350,00
5	Materiales y Suministros			2570,00	2.570,00
6	Transferencia de resultados				
7	Subcontratos y servicios ($\leq 20\%$)			90,00	90,00
	Total		10.678,00	3.270,00	13.838,00
	Porcentaje		76,36%	23,63%	100%

CAPITULO III:

6 RESULTADOS ESPERADOS:

- 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
- El efecto de la relación tiempo-concentración no es directamente proporcional a la concentración de los metales ni a la concentración del inóculo.
- La concentración del inóculo fue solo eficiente para cierto tipo de metales pesados
- Los parámetros ambientales no afectan directamente a la fijación del hongo por los metales pesados.

7 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 es asuperditada a su concentración.

8 BIBLIOGRAFIA

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/suelos.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 QuímicaViva Vol. 2, número 3, 2003 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. Novovny, 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_bioremediat.html
15. McCally M, Lif Support: The environment and Human Health. Massachusetts Institute of Tecnology 2002

16. Materiales y Métodos:

http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/laec/flores_l_b/capitulo5.pdf

17. Mendez-Vilas A. Current Research Topics in applied Microbiology and microbial Biotechnology. Singapore, 2009

18. Waldick L. ESTUDIO DE CASO: ECUADOR (MINERÍA) Minería, Contaminación y Salud en Ecuador. IDRC. 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: Evaluación de plantas tolerantes y optimización del proceso mediante prácticas agronómicas. 2000.

21. Sandoval, F. La Pequeña Minería en el Ecuador. 2001.

22. http://www.ucm.es/info/crismine/Geologia_Minas/Mineria_toxicidad.htm (Minerales, Metales, Compuestos Químicos, y Seres Vivos: Una Difícil Pero Inevitable Convivencia R. Oyarzun & P. Higuera)

9 ANEXOS

9.1 Cuadro 1: Límites de toxicidad. La Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los Estados Unidos ha determinado una serie de límites para las concentraciones de metales pesados. Por encima de éstos los metales pueden causar graves trastornos en los seres vivos, y finalmente ocasionar la muerte. A continuación mostraremos dichos límites en distintos medios y las dosis máximas para la ingesta en los humanos.

Vida acuática en sistema de agua dulce (ríos lagos)

Metal	Dureza del agua (mg/l)	Límite máximo (µg/l)
As		50
Be		130 (+)
Cd	50	0.66 (*)
	150	1.10 (*)
	200	2.00 (*)
Cu	50	6.50 (*)
	150	12.00 (*)
	200	21.00 (*)
Hg		0.012 (*)
Ni	50	56.00 (x)

	150	96.00 (x)
	200	160.00 (x)
Pb	50	1.30 (*)
	150	3.20 (*)
	200	7.70 (*)
Zn	50	180.00 (#)
	150	320.00 (#)
	200	570.00 (#)

Consumo por los seres humanos:

As	0.05 mg/l (+)
Cd	10 µg/l (*)
Cr	0.05 mg/l (+)
Cu	1.0 µg/l (#)
Hg	144 ng/l (*)
Ni	632.0 µg/l (*)
Pb	50.0 µg/l (*) (adultos)

Zn	5.0 µg/l (*)
----	--------------

+: Concentración promedio por 1 hora; x: concentración promedio en 24 horas; *: concentración promedio en 4 días; #: niveles que no pueden excederse en ningún lapso de tiempo.

Fuente: Oyarzun R; Higuera P. *Minerales, Metales, Compuestos Químicos y seres vivos: Una Difícil Pero Inevitable Convivencia.*

9.2 Cuadro 2: Los Metales pesados más importantes sus densidades, abundancia y su categoría como esenciales y/o contaminantes.

Elemento	Densidad g/cm ³	Rocas mg/kg	Esencial	Contamínate Animal/Vegetal
Ag	10.5	0.07		X
Au	19.3	0.05		
Bi	9.8	0.17		X
Cd	8.7	0.2		X
Cr	7.2	100.0	X	X
Co	8.9	25.0	X	X
Cu	8.9	55.0	X	X
Fe	7.9	6x10 ⁴	X	X
Hg	13.6	0.08		X
La	6.2	25.0		X
Mn	7.4	950.0	X	X
Pb	11.3	13.0		X
Mo	10.2	1.5	X	X
Ni	8.9	75.0	X	X
Pt	21.5	0.05		
Tl	11.9	0.45		X
Th	11.5	9.6		X
Sn	7.3	2.0	X	X
U	19.1	2.7		X
V 6.1	135.0			X

W	19.3	1.5	X	X
Zn	7.1	70.0	X	X
Zr	6.5	165.0		X

Fuente: Davis, 1980.

9.3 Cuadro 2: Los principales impactos ambientales de la minería aurífera a pequeña escala en el Ecuador.

		Área / Cuenca de conflicto potencial	Grado de impacto
Uso del suelo	Pérdida de tierras agrícolas	Todas las cuencas	No significativo
	Pérdida de tierras para viviendas	Portovelo - Zaruma	Significativo
Biota	Perdida de la biodiversidad	Río Puyango	Severo
	Incorporación de metales pesados por organismos	Río Siete/ Río Chico	Significativo
	Acumulación de Hg por organismos		Significativo
Recursos hídricos	Perdida de agua potable y para irrigación	Río Siete	Severo
	Perdida de agua para cultivo acuático		Severo
Otras actividades económicas	Impacto en industrias de camarones		Sin impacto
	Impacto en industrias bananeras		
Salud Humana	Sujeto a investigaciones e informes especiales		

Fuente: Sandoval, La Pequeña Minería en el Ecuador. 2001

9.4 Cuadro 3: Costo de Materiales.

CANTIDAD	DESCRIPCION	V.UNITARIO	V.TOTAL
1	CAJA PETRI VIDRIO 90 X 18 MM	2,25	2,25
1	MICROPIPETA 5 UL	120,00	120,00
1	PUNTAS PARA MICROPIPETA X 1000 UNID BLANCAS	12,50	12,50
1	TERMOHIDROMETRO DIGITAL 0 - 50 °c, 25 - 95 HUMEDAD	70,00	70,00
1	AGUA DESTILADA X GALON	1,40	1,40
1	PIPETA SEROLOGICA 5 ML	2,50	2,50
1	PIPETA SEROLOGICA 10 ML	3,25	3,25
1	PIPETA SEROLOGICA 25 ML	6,25	6,25
1	INCUBADORA 34 LT	1.800,00	1.800,00
1	ESPECTOFOTOMETRO + BAÑO SECO PARA 16 TUBOS	4.500,00	4.500,00
1	CRISOL PORCELANA 30 ML CON TAPA	5,50	5,50
1	HORNO (MUFLA)	4.000,00	4.000,00
1	DESECADOR CON PLATO PORCELANA	200,00	200,00
1	VASO PRECIPIT VIDRIO 600 ML	5,30	5,30
1	MORTERO PORELANA CON PISTILO	13,40	13,40
1	VIDRIO RELOJ 80 MM	2,50	2,50
1	AGITADOR MAGNETICO + CALENTADOR	1.000,00	1.000,00
1	PAPEL FILTRO # 40 X 100 UNID (EQUIVALENTE)	45,00	45,00
1	MATRAZ VOL 100 ML CON TAPA VIDRIO	9,90	9,90
1	TUBO DE ENSAYO 150 X 20 MM C/TAPA ROSCA	2,25	2,25
1	PERILLA GOTERO DE VIDRIO	1,00	1,00
1	SABORAUD DEXTROSA AGAR X 500 GRAMOS	90,00	90,00
1	MALT EXTRACT AGAR X 500 GRAMOS	300,00	300,00
1	ACIDO CLORHIDRICO 10 % X 100 ML	10,00	10,00
1	ACIDO NITRICO X LITRO	2,00	2,00
		SUB-TOTAL:	12.205,00
		12% IVA:	1.464,60
		VALOR TOTAL:	13.669,60

Fuente: LABORATORIO CEVALLOS S.A. Guayaquil – Ecuador, 2011.

9.5 Cuadro 4. Costo de la Cepa Hongo Pleurotus Ostreatus.

Cepa	Precio Total
Hongo congelado ATCC® Number: 32783™ Pleurotus ostreatus (Jacquin: Fries) Kummer, teleomorph.	\$275.00

Fuente: ATCC, <http://www.atcc.org>

9.6 Cuadro 5. Costo de recursos bibliográficos.

Recursos Bibliográficos	Precio
Internet	150,00
Computadora	700,00
Tinta	50,00
	Total: 900,00