



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

**“EFICACIA DE LOS CONSORCIOS BACTERIANOS Y FÚNGICOS
NATIVOS EN LA REMOCIÓN DE METALES PESADOS POR
BIOLIXIVIACIÓN DE LOS SEDIMENTOS DE LA LAGUNA DE SAN
ANTONIO DE PADUA DE LA CIUDAD DE RIOBAMBA”**

TRABAJO DE TITULACIÓN

PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTOR: GEOVANNY ALEJANDRO FLORES CÁRDENAS

TUTOR: DR. ROBERTO ERAZO

Riobamba – Ecuador

2015

CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: **“EFICACIA DE LOS CONSORCIOS BACTERIANOS Y FÚNGICOS NATIVOS EN LA REMOCIÓN DE METALES PESADOS POR BIOLIXIVIACIÓN DE LOS SEDIMENTOS DE LA LAGUNA DE SAN ANTONIO DE PADUA DE LA CIUDAD DE RIOBAMBA”**, de responsabilidad del señor egresado Geovanny Alejandro Flores Cárdenas, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dr. Roberto Erazo
**DIRECTOR DE TRABAJO
DE TITULACIÓN**

Dra. Nancy Veloz
MIEMBRO DE TRIBUNAL

“Yo, Geovanny Alejandro Flores Cárdenas, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la Escuela Superior politécnica de Chimborazo”

Geovanny Alejandro Flores Cárdenas

DEDICATORIA

Por el amor y sacrificio de mis padres este logro es para ustedes, gracias por darme la fortaleza para alcanzar mis metas.

A mi hija hermosa Kristhell, por ser la luz de mis ojos y mi inspiración de vida.

A mi esposa Mishell, complemento fundamental en mi vida.

A la memoria de mi abuelita Carmela Naranjo, que desde el cielo me sigue guiando y brindando su amor y cariño.

A toda la familia, por la confianza depositada.

A todos mis amigos, que arrimaron el hombro y su invaluable apoyo.

Alejandro Flores

AGRADECIMIENTO

A mi Dios, por darme la fortaleza y sabiduría en cada día de mi vida.

A mis padres Geovanny y Cecilia, por enseñarme afrontar las adversidades con responsabilidad y honestidad.

A mi esposa Mishell, por el amor, cariño y comprensión en cada momento.

A mis hermanos Freddy, Luis y Renato, por impulsarme a alcanzar mis sueños y aspiraciones.

A la Dra. Nancy Veloz y Dr. Roberto Erazo, por depositar la confianza en la realización de la investigación.

A quienes integran el CESTTA, de manera especial a la Ing. Marcela Erazo, Ing. Verónica Bravo, Dr. Kleber Iza, Ing. Cristian Chuquin, Ing. Jorge Miranda, por su constante apoyo para relucir la investigación.

A mi amiga Cristina Cáceres, por su apoyo constante y amistad incondicional.

A la Ing. Paola Chiluzza y Dra. Norma Erazo, por su asesoramiento y colaboración prestada.

Alejandro Flores

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	iv
ÍNDICE DE GRÁFICOS	v
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	vi
ÍNDICE DE ANEXOS	vii
RESUMEN	viii
SUMMARY	ix
INTRODUCCIÓN	- 1 -
JUSTIFICACIÓN	- 2 -
OBJETIVOS	- 3 -
GENERAL	- 3 -
ESPECÍFICOS	- 3 -
CAPÍTULO I	- 4 -
1. MARCO TEÓRICO	- 4 -
1.1. Biorremediación	- 4 -
1.1.1. <i>Mecanismos biológicos aplicables a la biorremediación de sedimentos</i>	- 4 -
1.2. Biolixiviación	- 6 -
1.2.1. <i>Mecanismo de Biolixiviación microbiana</i>	- 6 -
1.2.2. <i>Diversidad de microorganismos en un sistema de biolixiviación</i>	- 7 -
1.2.3. <i>Factores que influyen en la biolixiviación</i>	- 8 -
1.3. Microorganismos de lixiviación	- 8 -
1.3.1. <i>Bacterias</i>	- 8 -
1.3.2. <i>Hongos</i>	- 9 -
1.4. Sedimentos	- 10 -
1.4.1. <i>Sedimentos lacustres</i>	- 10 -
1.4.2. <i>Origen y composición de los sedimentos lacustres</i>	- 11 -
1.5. Metales pesados	- 11 -
1.5.1. <i>Contaminación de sedimentos por metales pesados</i>	- 12 -
1.5.2. <i>Interacciones microorganismos- metales</i>	- 12 -
1.5.3. <i>Transformaciones para tratamiento de metales</i>	- 14 -
CAPITULO II	- 15 -
2 MATERIALES Y MÉTODOS	- 15 -
2.1 Área de investigación	- 15 -
2.1.1 <i>Ubicación geográfica</i>	- 15 -

2.1.2	<i>Delimitación del área de estudio</i>	- 15 -
2.1.2.1	<i>Área de influencia directa</i>	- 15 -
2.1.2.2	<i>Área de influencia indirecta</i>	- 15 -
2.1.2.3	<i>Objeto de estudio</i>	- 16 -
2.2.	Descripción del área de investigación	- 16 -
2.2.1	<i>Características físicas</i>	- 16 -
2.2.1.1	<i>Geología</i>	- 16 -
2.2.1.2	<i>Geomorfología</i>	- 16 -
2.2.1.3	<i>Climatología</i>	- 17 -
2.2.1.5	<i>Hidrología</i>	- 18 -
2.2.1.6	<i>Precipitación</i>	- 18 -
2.2.1.7	<i>Heliofanía</i>	- 19 -
2.2.1.8	<i>Humedad Relativa</i>	- 19 -
2.2.1.9	<i>Velocidad y dirección del viento</i>	- 20 -
2.3	Materiales experimentales	- 26 -
2.3.1	<i>Área experimental</i>	- 26 -
2.4	Diseño experimental	- 28 -
CAPITULO III		- 30 -
3.	PARTE EXPERIMENTAL	- 30 -
3.1	Procesamiento de muestras biológicas	- 30 -
3.1.1	<i>Materiales equipos y reactivos</i>	- 30 -
3.1.2	<i>Procedimiento</i>	- 31 -
3.2	Aislamiento y purificación de las cepas fúngicas	- 31 -
3.2.1	<i>Materiales equipos y reactivos</i>	- 31 -
3.2.2	<i>Procedimiento</i>	- 32 -
3.3	Identificación y caracterización de las cepas fúngicas.	- 32 -
3.3.1	<i>Materiales equipos y reactivos</i>	- 33 -
3.3.2	<i>Procedimiento</i>	- 33 -
3.4	Conservación de cepas fúngicas	- 33 -
3.4.1	<i>Materiales, equipos y reactivos</i>	- 34 -
3.4.2	<i>Procedimiento</i>	- 34 -
3.5	Preparación del inóculo líquido fúngico	- 34 -
3.5.1	<i>Materiales, equipos y reactivos</i>	- 35 -
3.5.2	<i>Procedimiento</i>	- 35 -
3.6	Reactivación de cepas bacterianas	- 35 -
3.6.1	<i>Materiales equipos y reactivos</i>	- 36 -

3.6.2	<i>Procedimiento</i>	- 36 -
3.7	Preparación del inóculo líquido bacteriano	- 37 -
3.7.1	<i>Materiales, equipos y reactivos</i>	- 37 -
3.7.2	<i>Procedimiento</i>	- 37 -
3.8	Métodos analíticos	- 38 -
3.8.2	<i>Determinación de pH</i>	- 39 -
3.8.3	<i>Determinación de humedad</i>	- 39 -
3.8.4	<i>Determinación de temperatura</i>	- 40 -
3.9	Métodos microbiológicos	- 40 -
3.9.1	<i>Determinación de concentración bacteriana</i>	- 40 -
CAPITULO IV		- 41 -
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	- 41 -
4.1	Análisis físico-químico del sedimento	- 41 -
4.2	Identificación de cepas bacterianas	- 42 -
4.3	Identificación de cepas fúngicas	- 43 -
4.4	Prueba de biolixiviación de metales	- 45 -
4.4.1	<i>Inóculo bacteriano y fúngico</i>	- 45 -
4.4.2	<i>Biolixiviación en pilas</i>	- 45 -
4.5	Análisis de datos experimentales	- 46 -
4.5.1	<i>Obtención del sedimento sujeto a biolixiviación</i>	- 46 -
4.5.2	<i>Caracterización y parámetros de análisis del sedimento</i>	- 46 -
4.5.3	<i>Análisis de unidades de control</i>	- 46 -
4.6	Seguimiento de variables de control	- 48 -
4.6.1	<i>Temperatura y humedad en proceso de biolixiviación</i>	- 48 -
4.6.2	<i>pH en proceso de biolixiviación</i>	- 49 -
4.6.3	<i>Carga bacteriana</i>	- 50 -
4.6.4	<i>Carga fúngica</i>	- 51 -
4.7	Eficacia del proceso de biolixiviación	- 51 -
4.7.1	<i>Influencia de los consorcios bacterianos y fúngicos</i>	- 52 -
4.7.2	<i>Influencia del tipo de metal sobre la concentración biolixiviada</i>	- 53 -
4.7.3	<i>Influencia del tratamiento sobre la concentración de metales en el lixiviado</i>	- 54 -
4.7.4	<i>Relación de variables de control</i>	- 55 -
CONCLUSIONES		- 58 -
RECOMENDACIONES		- 59 -
BIBLIOGRAFÍA		
ANEXOS		

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

As	Arsénico
Ba	Bario
CESTTA	Centro de Soluciones Técnicas y Transferencia Tecnológica Ambiental
Ca	Calcio
Cd	Cadmio
Co	Cobalto
Cu	Cobre
Cu₂S	Sulfuro de Cobre
CuSO₄	Sulfato de Cobre
CO₂	Dióxido de carbono
CH₄	Metano
Cr	Cromo
Cs	Cesio
°C	Grados Centígrados
EPA	Enviromental Protection Agency
ESPOCH	Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
Fe	Hierro
FeO	Óxido de hierro
g	Gramos
h	Hora
Ha	Hectáreas
Hg	Mercurio

H₂SO₄	Ácido sulfúrico
ICP	Inducción Acoplada de Plasma
K	Potasio
Kg	Kilogramos
KH₂PO₄	Fosfato diácido de Potasio
m	Metro
mg	Miligramos
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
mL	Mililitros
mV	Milivoltios
mm Hg	Milímetros de Mercurio
Mg	Magnesio
Mn	Manganeso
Mo	Molibdeno
MgSO₄	Sulfato de Magnesio
N	Nitrógeno
Ni	Niquel
NaCl	Cloruro de Sodio
NH₄Cl	Cloruro de Amonio
P	Fósforo
ppm	Partes por millón
PDA	Patata Dextrosa Agar
pH	Potencial de Hidrógeno
L	Litro
s	Segundo

S°	Azufre elemental
Se	Selenio
SENPLADES	Secretaria Nacional de Planificación y Desarrollo
TPH	Hidrocarburos Totales de Petróleo
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
V	Vanadio
Zn	Cinc
%	Porcentaje
°	Grados

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2: Temperatura Mensaul de Riobamba-Año 2014	17
Tabla 2-2: Heliofanía.	19
Tabla 3-2: Humedad Relativa	19
Tabla 4-2: Velocidad y Direccion del Viento	20
Tabla 5-2: Flora Laguna de San Antonio	21
Tabla 6-2: Avifauna Laguna de San Antonio.....	23
Tabla 7-2: Mastofauna Laguna de San Antonioas	25
Tabla 8-2: Herpetofauna Laguna de San Antonio.....	26
Tabla 9-2: Materiales Experimentales.....	27
Tabla 10-2: Equipos Experimentales	27
Tabla 11-2: Caracteristicas de la Investigaci3n.....	28
Tabla 1-4: Caracterizacion Fisico Quimica del Sedimento	41
Tabla 2-4: Cepas Bacterianas de la Laguna de San Antonio.....	42
Tabla 3-4: Caracteristicas Macroscopicas y Microscopicas de Cepas F3ngicas.....	44
Tabla 4-4: Concentraci3n Inicial de Metales en los Sedimentos	47
Tabla 5-4: Concentraci3n de Metales en el Lixiviado	47
Tabla 6-4: Registro Inicial de UFC en el Sedimento	50
Tabla 7-4: Registro de UFC Posterior a la Inoculaci3n Bacteriana	50
Tabla 8-4: Registro Inicial de UFC en el Sedimento	51
Tabla 9-4: Registro de UFC Posterior a la Inoculaci3n de Hongos	51
Tabla 10-4: Registro de Concentraci3n de metales.....	52

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-2: Diagrama Ombrotérmico Riobamba 2014.....	18
Gráfico 1-4: Volumen de lixiviación	47
Gráfico 2-4: Variación de Temperatura de la Unidades Experimentales.....	48
Gráfico 3-4. Variación de Humedad de las Unidades Experimentales	49
Gráfico 4-4. Variación de pH de las Unidades Experimentales.....	49
Gráfico 5-4. Comparación múltiple del tratamiento	54
Gráfico 6-4. Región de rechazo Kruskall Wallis	55
Gráfico 7-4. Relación de variables de control-bacterias	56
Gráfico 8-4. Relación de variables de control-hongos	57

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1-1: Interacciones entre metales y microorganismos	-5-
Ilustración 2-1: Biolixiviación en pilas	-6-
Ilustración 1-3: Preparación de cajas con agar	-31-
Ilustración 2-3: Aislamiento y purificación de cepas	-32-
Ilustración 3-3: Observación de placas al microscopio	-33-
Ilustración 4-3: Conservación de cepas fúngicas	-34-
Ilustración 5-3: Preparación inóculo líquido fúngico	-35-
Ilustración 6-3: Reactivación de cepas bacterianas	-36-
Ilustración 7-3: Preparación inóculo líquido bacteriano.	-37-
Ilustración 8-3: Inducción Acoplada de Plasma	-38-
Ilustración 1-4: Cepa bacteriana nativa	-42-
Ilustración 2-4: Pilas de biolixiviación	-45-

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A. Recuento en placa	-64-
Anexo B. Recuento bacteriano inicial	-65-
Anexo C. Conteo bacteriano posterior inoculación.....	-66-
Anexo D. Aislamiento y purificación de hongos	-67-
Anexo E. Especies fúngicas nativas identificadas.....	-69-
Anexo F. Observación microscópicas especies fúngicas	-71-
Anexo G. Registro de parámetros de control	-73-
Anexo H. Análisis físico químico del sedimento	-74-
Anexo I. Análisis físico químico del lixiviado.....	-75-
Anexo J. Mapa de ubicación laguna de San Antonio.....	-78-
Anexo K. Mapa geológico del cantón Riobamba.....	-79-
Anexo L. Mapa geomorfológico del cantón Riobamba	-80-
Anexo M. Mapa hidrológico del cantón Riobamba	-81-
Anexo N. Mapa climático del cantón Riobamba	-82-
Anexo Ñ. Toma de muestras de sedimentos	-83-
Anexo O. Siembra de hongos.....	-84-

RESUMEN

Se realizó la biolixiviación de metales pesados de los sedimentos de la Laguna San Antonio de Padua de la ciudad de Riobamba, Provincia de Chimborazo. Se realizó la caracterización física química del sedimento y se determinó contaminación por Ba, Cu y V. Se efectuó la reactivación de las cepas bacterianas a partir de bancos primarios almacenados en el Centro de Soluciones Técnicas y Transferencia Tecnológica Ambiental y se identificó los géneros de las cepas fúngicas mediante análisis morfológico y se purificó a través de la técnica de siembras sucesivas.

Se procedió a realizar la biolixiviación en pilas, el proceso se ejecutó con la inoculación líquida de consorcios bacterianos y fúngicos nativos para desplazar los metales del sedimento hacia el lixiviado. Utilizando equipos como: Cámara de flujo laminar horizontal, autoclave, incubadora, inducción acoplada de plasma (ICP), estufa, entre los principales. Se conformaron dos consorcios microbianos el bacteriano conformado por *Xenorhabdus nematophilys* y *E.coli* inactiva y el consorcio fúngico constituido por los géneros *Xylohypha*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Cladosporium* y *Humicola*, hongos de tipo filamentoso.

En función de la prueba de biolixiviación, mediante el uso del consorcio bacteriano se obtiene concentraciones de Ba= 3,96 mg/L, V= 0,0448 mg/L y Cu= 0,0585 mg/L y en el caso del consorcio fúngico Ba= 1,68 mg/L, V= 0,1119 mg/L y Cu= 0,0579 mg/L; concentraciones relativamente bajas en el licor de lixiviación.

Luego de mi investigación hemos concluido que la biolixiviación no es eficaz en desplazar Ba, Cu y V, por cuanto los consorcios nativos no son capaces de producir ácidos orgánicos con capacidad biolixivante, por otro lado, sin bien los consorcios microbianos disponen de condiciones óptimas de crecimiento, en el método de pilas no resultan altamente selectivos en la extracción de metales pesados.

Se recomienda ampliar la investigación en el uso de consorcios bacterianos y fúngicos en medios ácidos y básicos, además realizar estudios con la cepa fúngica *Aspergillus Niger* cepa con gran potencial de biolixiviación al producir ácido cítrico en su actividad metabólica, a fin reducir los impactos ambientales en medios lacustres.

Palabras clave: <BIOLIXIVIACIÓN> <SEDIMENTOS> <LAGUNA DE SAN ANTONIO>
<BARIO [Ba]> <VANADIO [V]> <COBRE [Cu]> <CONSORCIOS BACTERIANOS>
<CONSORCIOS FÚNGICOS>

SUMMARY

The bioleaching of heavy metals from sediments was carried out in San Antonio de Padua Lake from Riobamba city, Province of Chimborazo, the physical and chemical sediment characterization was made determining the contamination by Ba, Cu and V. The bacterial strains reactivation was made from master cell banks stored at the Technical Solutions Center and Environmental Technology Transfer identifying the fungal genus strains through morphological analysis and was purified with the successive sowing technique.

The heap bioleaching was carried out, the process was executed with liquid inoculation both bacterial and fungal native consortium to remove metals found in the sediments to the leaching. Using equipment such as: horizontal laminar flow bench, autoclave, incubator, inductively coupled plasma (ICP), stove. Two microbial consortium were formed by *Xenorhabdus nematophilys* and *E.coli* inactiva and the fungal consortium composed by the genus géneros *Xylohypha*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillum*, *Cladosporium* y *Humicola*, type in fungi filamentous.

Based on the bioleaching test, through the use of bacterial consortium obtaining concentrations of Ba= 3,96 mg/L, V= 0,0448 mg/L and Cu= 0,0585 mg/L and the case of fungal consortium Ba=]1,68 mg/L, V= 0,1119 mg/L y Cu= 0,0579 mg/L; concentrations are relatively low in leaching liquor.

It is concluded that the bioleaching is not effective removing Ba, Cu and V because the native consortium are not capable to produce organic acid with bioleaching capacity, on the other hand while the microbial consortium have optimal growing conditions, in the heap leaching method are not highly selective in the extraction of heavy metals.

It is recommended the research be expanded in the use of bacterial and fungal consortium in basic and acidic media, moreover to carry out studies with the *Aspergillus Niger* fungal strain which has a great potential of bioleaching producing citric acid in its metabolic activity, reducing environmental impact in lacustrine system.

Clue words: <BIOLEACHING> <SEDIMENTS> <SAN ANTONIO LAKE> <BARIUM [Ba]> <VANADIUM [V]> <COPPER [Cu]> <BACTERIAL CONSORTIUM> <FUNGAL CONSORTIUM>

INTRODUCCIÓN

La Laguna de San Antonio de Padua actualmente presenta un deterioro acelerado y evidente, la presencia de residuos en su espejo de agua, la deforestación, procesos artificiales y asentamientos humanos en las riberas de la laguna y su cuenca de drenaje; han provocado obstrucción de las escorrentías superficiales durante la temporada de lluvia, problemas en su superficie como consecuencia del azolvamiento en su interior y la eutrofización; representando así una amenaza en la conservación de este recurso.

Las lagunas semiurbanas son las que presentan mayor vulnerabilidad, cuando de manejar su condición ambiental se trata, puesto que sus drenajes soportan una alta intensidad del uso de la tierra, condicionando el proceso de autodepuración natural y generando la contaminación de los sedimentos, específicamente con la presencia de metales pesados (Ba, Cu, V) cuya liberación puede afectar a la calidad del sedimento y del agua subterránea así como a las plantas y a la salud de los animales.

La diversidad metabólica de microorganismos lacustres ha permitido sus aplicaciones en diferentes procesos biotecnológicos y aprovechar este recurso se convierte en una alternativa de recuperación de la laguna a nivel ambiental y social, con la premisa de que la Laguna de San Antonio mantenga ese atractivo turístico que le ha caracterizado.

En tal virtud, resultando factible la biolixiviación como una de las posibles vías para la remoción de compuestos tóxicos, al constituirse un sistema biológico con grandes ventajas al requerir una inversión moderada de capital, bajo consumo de energía, proceso simple, no genera residuos y es ambientalmente seguro, es decir, sostenible en términos de economía y eficiencia.

JUSTIFICACIÓN

Los recursos lenticos son los que presentan mayor vulnerabilidad, cuando de manejar su condición ambiental se trata, puesto que sus drenajes soportan una alta intensidad del uso de la tierra, lo que ha condicionado el proceso de autodepuración natural, generando factores que inciden directamente en la contaminación de los sedimentos de la laguna.

Considerando el estado actual de la laguna de San Antonio de Padua, somos conscientes de la importante recuperación de los sedimentos de este cuerpo de agua; situación que permite el desarrollo de la investigación y con ello determinar las técnicas de remediación específicas para el área de interés.

Actualmente en la ciudad de Riobamba no existen investigaciones que sustenten estudios de recuperación de lagunas, por cuanto el estudio tiene una gran importancia significativa ya que contempla el aprovechamiento de la actividad simbiótica de especies bacterianas y fúngicas nativas en la degradación de metales pesados a formas inocuas, mitigando así la contaminación ambiental.

El presente proyecto ha sido financiado por el Centro de Soluciones Técnicas y Transferencia Tecnológica Ambiental (CESTTA) de Riobamba, a fin de contribuir en la recuperación ambiental y en la determinación de los parámetros eficaces para la biolixiviación de metales pesados y de esta forma generar datos técnicos que aporten en la investigación titulada “Identificación, Caracterización y Validación del Consorcio Bacteriano Nativo y Aplicación en los Sedimentos de la Laguna San Antonio, Riobamba Ecuador” y ser base para investigaciones y diseños; encaminados a la biorecuperación de recursos lenticos ubicados en diferentes ciudades, y así integrar el ámbito ambiental con el urbano.

El desarrollo de la investigación contribuirá a que la población del cantón Riobamba y los habitantes del área de influencia directa se beneficien en cuanto a calidad y salud ambiental, mantener en equilibrio el hábitat de numerosas especies animales y vegetales, además de ser un aporte para alcanzar el desarrollo sostenible de la comunidad, cantón y provincia en general.

OBJETIVOS

GENERAL

- Evaluar la eficacia de los consorcios bacterianos y fúngicos nativos en la remoción de metales pesados por biolixiviación de los sedimentos de la laguna de San Antonio de Padua del cantón Riobamba.

ESPECÍFICOS

- Determinar la concentración de metales pesados del sedimento de la laguna.
- Identificar las cepas bacterianas y fúngicas nativas para biolixiviar los metales pesados.
- Aplicar el método de pilas para biolixiviar los metales pesados.
- Determinar la eficiencia del proceso de biolixiviación de los metales pesados.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1. Biorremediación

El término biorremediación, hace referencia a los tratamientos en los que se usa microorganismos (bacterias, hongos, levaduras y algas) para restaurar, limpiar el suelo, agua superficial o subterránea y aire que presentan alteración por contaminantes xenobióticos, ya sea eliminándolos, atenuándolos o transformándolos en compuestos menos contaminantes.

La transformación de dichos contaminantes puede ser:

- Parcial que es la obtención de un compuesto menos tóxico
- Total en condiciones aerobias ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$) o condiciones anaerobias ($\text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$)

Según el contaminante que presente el entorno, los microorganismos presentes pueden modificar su movilidad en el medio, cambiando sus características físico-químicas (BARRIOS, Y., 2011, p.45)

1.1.1. *Mecanismos biológicos aplicables a la biorremediación de sedimentos*

Los procesos biológicos para remediación de sedimentos principalmente se enfocan en la degradación de compuestos orgánicos, pero también es posible aplicarlos en contaminantes inorgánicos.

La remediación de entornos contaminados con metales pesados con ayuda de microorganismos, se lleva a cabo a través de cambios en el estado redox de los mismos, favoreciendo procesos que modifican la solubilidad, movilidad y/o toxicidad de los contaminantes lo que hace posible la remediación (VOLKE, Tania., et al., 2005, p.76).

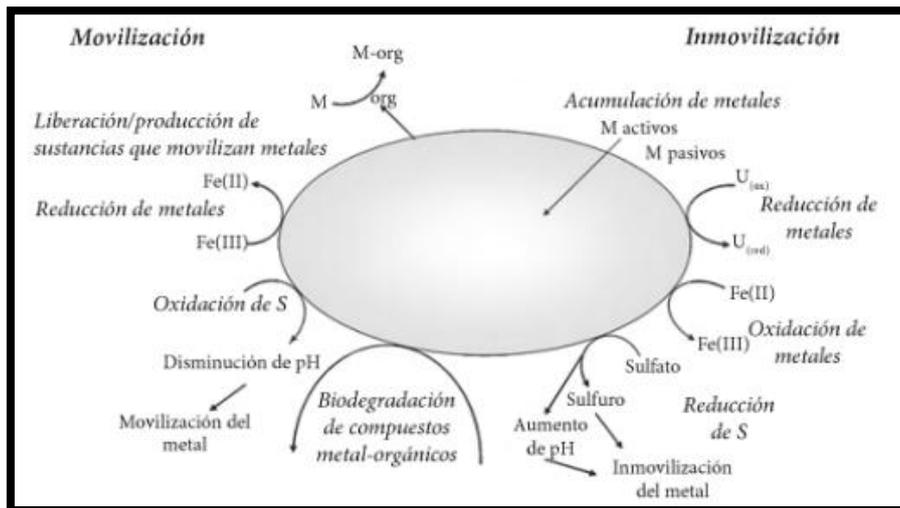


Ilustración. 1-1: Interacciones entre metales y microorganismos
Fuente: FLORES, A. 2015

1.1.1.1. Separación o inmovilización

Basada en mecanismos de biosorción, variaciones en el estado de óxido reducción, así como en volatilización y/o precipitación, acumulación de contaminantes por medio de fitorremediación.

1.1.1.2. Disolución o movilización

Abarca procesos de biolixiviación tanto de metales como de metaloides, así como cambios en el estado de óxido reducción, facilitando la disolución o volatilización de los contaminantes.

En base a lo mencionado, la remediación de contaminantes orgánicos puede darse con éxito conforme los siguientes principios:

- Precipitación del contaminante (inmovilización)
- Reducción de la concentración del metal de su matriz
- Separación del metal de ambientes sensibles (VOLKE, Tania., et al., 2005, p.79).

1.2. Biolixiviación

La biolixiviación (movilización microbiana de metales) se fundamenta en el potencial que tienen los microorganismos para solubilizar metales que se encuentran en matrices insolubles, convirtiéndolas en formas más solubles que permiten su extracción y posterior recuperación de manera más fácil que con la aplicación de métodos convencionales.

La capacidad de los microorganismos se fundamenta principalmente en la formación de ácidos orgánicos e inorgánicos (MIDENCE, R., GARCÍA, J., 2013, p.117).

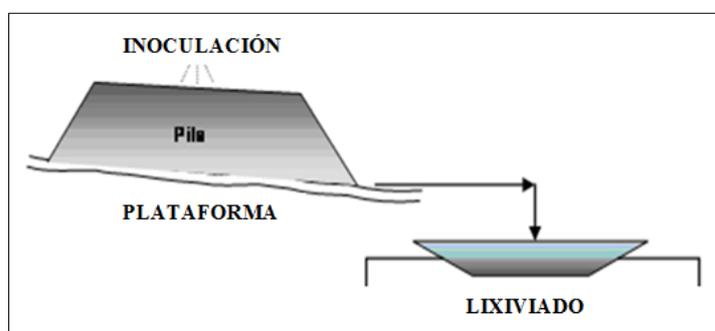


Figura. 2-1: Biolixiviación en pilas
Fuente: FLORES, A. 2015

1.2.1. Mecanismo de Biolixiviación microbiana

Habitualmente, los microorganismos implicados en la movilidad de metales los realizan a través de su oxidación, reducción, acumulación y sus metabolitos durante el proceso de biolixiviación.

Ciertos microorganismos poseen mecanismos específicos de biolixiviación, entre los que se encuentran *A. niger*, *P. simplicissimum*, *P. purpurogenum* (producción de metabolitos de bajo peso molecular), de *R. rubra*, *A. thiooxidans* y *A. ferrooxidans* (MIDENCE, R., GARCÍA, J., 2013, p.116).

1.2.1.1. *Lixiviación heterotrófica (químico organotrófica).*

Se fundamenta en la capacidad de los microorganismos de acidificar su ambiente (flujo de protones vía membrana plasma H⁺-ATPasas) con el fin de mantener el balance de carga y acumular dióxido de carbono.

Durante la acidificación ocurre la liberación de los metales, esta puede darse por varias rutas:

- Competición entre protones y el metal
- Competición entre protones y un no metal.

También se puede lograr una lixiviación como resultado del flujo de ácidos orgánicos que tienen la capacidad de proveer ambos protones y aniones (citrato y oxalato) para la formación de complejos estables con la mayoría de metales (MIDENCE, R., GARCÍA, J., 2013, p.123).

1.2.1.2. *Lixiviación Autotrófica (químico autotrófica)*

Esta es llevada a cabo en su mayoría por bacterias sulfuro – oxidante y bacterias acidofílicas que tienen la capacidad de fijar el dióxido de carbono obteniendo energía de la oxidación del FeO o de compuestos de azufre reducido (MIDENCE, R., GARCÍA, J., 2013, p.119).

1.2.2. Diversidad de microorganismos en un sistema de biolixiviación

En todos los ambientes naturales, es posible encontrar una gran variedad de microorganismos como bacterias, arqueobacterias, hongos, presencia de estos se encuentra influenciada por dos factores principales la temperatura a la que están expuestos y la cantidad de nutrientes que disponen.

En los ambientes naturales asociados a la minería, es posible encontrar una variedad de microorganismos como bacterias y arqueas, pero en su mayoría bacterias, cuya población se encuentra fuertemente influenciada por la temperatura a la que están expuestas así como por los nutrientes presentes.

Cada especie de microorganismo presenta diferentes requerimientos nutricionales y energéticos, es por ello que la formación de consorcios podría resultar más beneficiosa que la utilización de una especie pura, para la biolixiviación de un mineral.

Así por ejemplo ciertos compuestos que no son oxidados por una especie de microorganismo, pueden ser oxidados por la otra (JUAREZ, A, 2004, p.87).

1.2.3. Factores que influyen en la biolixiviación

En general, se puede mencionar diversos parámetros que pueden controlarse y medirse, que influyen en los diversos procesos de biolixiviación:

- Cantidad de sustrato disponible
- Temperatura óptima de crecimiento para los microorganismos
- pH condicionante para los microorganismos.
- Familia y género de microorganismos.
- Condiciones químicas-físicas del medio o muestra

1.3. Microorganismos de lixiviación

1.3.1. Bacterias

1.3.1.1. Generalidades

Las bacterias son organismos unicelulares, de formas y tamaños variables. Generalmente miden entre 2 y 8 μm de largo y 0,2 y 2 μm de diámetro. Presentan formas variadas, esféricas también conocidos como cocos, bastoniformes denominados también bacilos y bacterias espirilares.

La pared celular de la bacterias es una estructura compleja y la responsable de la configuración de la célula, el proceso de Tinción Gram que nos permite clasificar a las bacterias en Gram positivas y Gram negativas se basa en la diferencia estructural de las paredes celulares de estas y el cómo reaccionan ante diferentes reactivos como el violeta de genciana o cloruro de metilrosanilina.

1.3.1.2. *Bacterias con capacidad de Biolixiviación*

A escala industrial, se han obtenido buenos resultados en lo referente a la recuperación de cobre proveniente de minerales naturales este se da por la oxidación de las menas de Cu_2S a CuSO_4 por la acción de las bacterias *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans*, entre otras especies.

Las bacterias pertenecientes al género *Acidithiobacillus* son considerados los microorganismos más importantes que pueden ser aplicados para la solubilización de metales, estos son bacilos gramnegativos aerobios, que no presentan esporulación, otra característica importante es que son microorganismos quimioautótrofos es decir que no requieren de una fuente orgánica de carbono, ya que pueden tomar el carbono del CO_2 .

Acidithiobacillus ferrooxidans y *Acidithiobacillus thiooxidans*, estos obtienen la energía necesaria para su metabolismo a partir de la catálisis de la oxidación aeróbica de compuestos reducidos de azufre como tiosulfato, azufre elemental y sulfuros, y obteniendo como producto final el H_2SO_4 (YAGNENTKOVSKY, N., 2011, p.6).

1.3.2. **Hongos**

1.3.2.1. *Generalidades de los Hongos*

Los hongos son organismos unicelulares y pluricelulares, que poseen estructuras hifales y obtienen sus nutrientes por medio de absorción, este tipo de nutrición es conocida como nutrición heterotrófica y puede darse de diversas formas como saprofita, simbiótica o parásita. Esta definición abarca a los organismos heterogéneos estudiados convencionalmente por micólogos (ESPINOSA, M., LUDEÑA, K., 2007, p.65).

1.3.2.2. *Clasificación*

El reino fungi generalmente se clasifica en cinco Filos: Zigomycota (zigomicetes); Ascomycota (ascomicetes); Basidiomycota (basidiomicetes); Chytridiomycota (chitridiomicetes); Deuteromycota (deuteromicetes), los criterios usados para la identificar y distinguir estos cinco filos incluyen desde patrones de reproducción, hasta características básicas de la estructura.

1.3.2.3. *Importancia*

Dentro de los principales usos que se le da a los hongos es la obtención de productos bioquímicos como ácidos orgánicos (cítrico, fumárico, láctico e itacónico) y giberilinas, la obtención de nuevos agentes farmacológicos como, antitumorales o inmuno-moduladores (ciclosporina), son productos obtenidos a partir de hongos que han adquirido gran importancia en el mercado.

Las levaduras y los hongos filamentosos tienen la capacidad de modificar o transformar compuestos usados en medicina, un ejemplo de estos es la cortisona.

En la actualidad se está potenciando el uso de hongos para el desarrollo de la biotecnología agrícola, medioambiental, e incluso industrial con el mejoramiento en los procesos de fermentación. (ESPINOSA, Mayra., LUDEÑA, Karina., 2007, p.75).

1.3.2.4. *Hongos con capacidad de biolixiviación*

Durante la biolixiviación, los microorganismos son los responsables de la movilidad de los metales por medio de su oxidación, reducción, acumulación y la producción de metabolitos.

Varios estudios detallan los mecanismos de biolixiviación según el tipo u especie de microorganismo. Por ejemplo, el mecanismo de biolixiviación de *A. niger*, *P. simplicissimum*, *P. purpurogenum* está relacionada con la producción de metabolitos de bajo peso molecular, principalmente de ácidos orgánicos (ácido glucónico, ácido pirúvico, ácido cítrico, ácido oxálico, ácido málico y ácido succínico), mecanismo muy diferente al que presenta *R. rubra*, *A. thiooxidans* y *A. ferrooxidans*.

1.4. Sedimentos

1.4.1. *Sedimentos lacustres.*

Materiales propios de recursos lenticos, en la que la sedimentación es controlada por el aporte de materiales clásicos, la química de sus aguas y el rango de fluctuaciones de la línea de costa, condiciones que determinan la génesis y composición del sedimento.

Existen cuatro tipos de sedimentos lacustres:

- **Químicos**, ocasionada por la precipitación de carbonatos y sales.
- **Biogeoquímicos**, comprenden depósitos formados por la actividad fisiológica de los organismos.
- **Orgánicos**, incluye minerales de organismos y materia orgánica.
- **Clásicos**, formados por fragmentos de otras rocas acumuladas por las aguas.

Desde el punto de vista meteorológico señalan los siguientes tipos:

- **Alógenos**, procedente de áreas externas al lago.
- **Endógenos**, originados por procesos que tienen lugar en la columna de agua.
- **Autógenos**, resultan de reacciones en el sedimento después de la deposición.

1.4.2. Origen y composición de los sedimentos lacustres

Existen dos fuentes principales que dan origen a los sedimentos lacustres, una de estas es el material arrastrado a la laguna o lago desde el área de drenaje del mismo, y la segunda son los sedimentos que se forman en la misma laguna por procesos físico-químicos y biológicos. Por estas condiciones, los sistemas lacustres son considerados uno de los medios sedimentarios con la mayor variabilidad composicional.

Esta variabilidad composicional abarca diversos tipos de sedimentos, como los sedimentos detríticos, sedimentos bioconstruidos o bioproducidos, que contienen variedad de precipitados químicos provenientes del agua, de la acumulación de material orgánico arrastrado hasta la laguna o producido por la misma.

1.5. Metales pesados

Los metales pesados provenientes de desechos domésticos, industriales o agrícolas constituyen una importante fuente antropogénica de contaminación, estos metales son peligrosos para el hombre, la biota y microbiota marina y para el ambiente en general. Bajo este escenario, los sedimentos, constituyen uno de los principales reservorios de estos elementos, y actúan como focos secundarios de contaminación en el sistema acuáticos.

Los sedimentos superficiales cercanos a zonas costeras y con presencia de asentamientos humanos presentan concentraciones relativamente elevadas de metales. La concentración de estos metales se relaciona con el tamaño de partículas, la cantidad de materia orgánica, lo que provoca una alteración en el equilibrio biogeoquímico y ecológico del ecosistema.

Por tal motivo, la determinación en los sedimentos, y en la biota marina de metales pesados, constituye un indicador de la fuente de contaminación y los impactos que estos pueden causar en el medio (CASTRO, G., VALDÉS, Jo., 2012, p.54).

1.5.1. Contaminación de sedimentos por metales pesados.

La contaminación por metales pesados se ha convertido en una de las formas más peligrosas para los ecosistemas acuáticos, estos elementos poco o nada biodegradables, tienden a bioacumularse; desencadenando alteraciones metabólicas, mutaciones y transformaciones anatómicas en la biota acuática; afectando así a los niveles superiores de la cadena alimenticia.

Metales pesados como el Hg, Cu, Ni, Pb, Co, Cd presentan gran toxicidad en concentraciones excesivas y al encontrarse en sedimentos prolonga el tiempo de residencia del contaminante en el recurso hídrico, retardando así la movilidad por su baja velocidad de biodegradación.

La interacción entre aguas y sedimentos durante la fase de sedimentación y suspensión puede afectar zonas menos contaminadas o entornos de elevada descarga hídrica.

En un sentido más amplio, en época lluviosa, aumenta la dispersión de los metales por la cuenca, debido al aumento de la cantidad de sedimentos atrapados en ésta, por lo tanto, las condiciones climáticas del entorno, son la clave para entender la movilidad del metal a lo largo de una cuenca de drenaje.

1.5.2. Interacciones microorganismos- metales

Los microorganismos en el ambiente están expuestos e interactúan con la presencia de varios tipos de metales y metaloides, esto lo realizan a través del desarrollo de mecanismos de defensa (en beneficio o perjuicio).

En la naturaleza, estos elementos están presentes como cationes, oxianiones, sales, óxidos o precipitados amorfos (insoluble). La interacción de los microorganismos con los metales depende de su organización celular (procariota o eucariota), ambos utilizan especies de metales para funciones estructurales y/o catalíticas, poseen la capacidad de unirse a iones metálicos presentes en el exterior de la superficie celular o transportarlos al interior de la célula (funciones intracelulares).

Por ejemplo, el Ca y Mg tiene funciones catalíticas, el V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo y Se en concentraciones bajas pueden participar en funciones catalíticas. Ciertos organismos procariotas presentan una serie de mecanismos para la modificación de metales (Cr, Mn, Fe, Co, Cu, As y Se) que funcionan como aceptores o donadores de electrones. Podemos identificar dos tipos de interacciones microorganismo-metal (VOLKE, T., et al., 2005, p.85):

1.5.2.1. *Interacciones metabólicas enzimáticas.*

- Captación de metales traza para su incorporación a metalo-enzimas o su utilización en la activación de enzimas.
- Utilización de metales o metaloides como donadores o aceptores de electrones en el metabolismo energético.
- Detoxificación enzimática de especies metálicas tóxicas.
- Biocorrosión enzimática anaerobia.

1.5.2.2. *Interacciones metabólicas no enzimáticas*

- Capacidad de microorganismos eucariotas o procariotas (vivos o muertos) de acumular metales.
- Algunos hongos y bacterias pueden promover la lixiviación selectiva o no selectiva (biolixiviación) de constituyentes metálicos de minerales con otros productos metabólicos.
- Precipitación de iones de metales tóxicos, por segregación de productos metabólicos inorgánicos (sulfuros, carbonatos, fosfatos) de los microorganismos

1.5.3. Transformaciones para tratamiento de metales

En cualquier ecosistema o entorno la presencia de metales pesados constituye una problemática principalmente por su toxicidad y persistencia, factores que no dependen solo de la concentración del metal, si no, del grado de biodisponibilidad de este.

A diferencia de los compuestos orgánicos contaminantes, los metales pesados no pueden ser degradados, pero hay alternativas que nos permiten reducir su biodisponibilidad y/o toxicidad, al realizar una serie de transformaciones (YAGNENTKOVSKY, Nadia., 2011, p.35).

1.5.3.1. Cambio en el estado de oxidación.

Ciertos metales como el Cr (VI), Mo (VI), As (V), Se (IV), que presentan un estado de oxidación alto, son más solubles, reactivos, móviles y tóxicos que cuando presentan un menor estado de oxidación donde sus características cambian, volviéndose menos tóxicos y biodisponibles, pero más insolubles.

1.5.3.2. Compuesto orgánico ↔ Compuesto inorgánico

Ciertos compuestos presentan la característica de presentar mayor toxicidad si están formados por compuestos orgánicos o viceversa. Un ejemplo de ello es el mercurio, que presenta mayor toxicidad cuando está en su forma de metilmercurio, pero cuando se encuentra formado por algún compuesto inorgánico su toxicidad es menor.

1.5.3.3. Movilización ↔ Inmovilización

Para la extracción de metales pesados contenidos en matrices sólidas o en soluciones, es posible movilizarlos o inmovilizarlos, de modo que se pueda disponer de ellos de manera adecuada.

CAPITULO II

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Área de investigación

2.1.1 *Ubicación geográfica.*

La Laguna San Antonio de Padua se encuentra ubicada en la Zona N°3 según la clasificación establecida por la Secretaria de Planificación y Desarrollo (SENPLADES), específicamente en el Km 1.5 de la vía intercantonal Riobamba-Guano, en la Provincia de Chimborazo, Cantón Riobamba, Parroquia Juan de Velasco.

2.1.2 *Delimitación del área de estudio.*

En la actualidad la laguna cuenta con área de 3,7 Ha, siendo necesaria la delimitación de sus orillas y perímetro, para llevar a cabo la investigación y con ello la conservación de este recurso.

2.1.2.1 *Área de influencia directa*

Para la determinación del área de influencia directa se consideró el contorno de la laguna, sus drenajes, las viviendas y cultivos aledaños.

Por lo tanto, por conveniencia a la investigación se estableció una zona de amortiguamiento de protección de 30m desde la laguna hacia la periferia, constituyendo 2,7 Ha para el área de influencia directa.

2.1.2.2 *Área de influencia indirecta*

Considerando la actividad antrópica de los moradores del sector, cuya acción influye en la calidad ambiental de la misma se determinó 8,5 Ha como área de influencia indirecta.

2.1.2.3 *Objeto de estudio*

La zona de estudio corresponde a los sedimentos de laguna, cuya ubicación es 17M 0762655 E 9817294 N, punto con presencia de metales Ba, Cu y V, de interés a la investigación.

2.2. Descripción del área de investigación

2.2.1 Características físicas

2.2.1.1 *Geología*

En el suelo del área de estudio se relaciona con la actividad volcánica del periodo cuaternario reciente del sector, específicamente el Chimborazo; predominando así los siguientes tipos de suelos:

- El entisol de color café claro a oscuro corresponde a la desintegración de material piroclástico, con una textura de grano fino a medio-arenoso-limoso.
- El molisol de color café oscuro a negro, contiene gran cantidad de materia orgánica y una textura de grano medio a fino-limo arenoso-arcilloso.

2.2.1.2 *Geomorfología*

Riobamba se asienta en la altiplanicie de Tapi que vas desde los 2500 a 3000 m.s.n.m, prevaleciendo zonas planas y pequeñas colinas.

La depresión interactiva es característica, predominando rasgos morfológicos de un hundimiento tectónico limitadas por fallas longitudinales en dirección norte-sur, misma que han desencadenado en erosión fluvial.

La morfogénesis está relacionada con las fases de relleno y depósitos de materiales detríticos en su basamento, que se cubrieron por potentes depósitos volcánicos y flujos de lava provenientes del Chimborazo.

Posteriormente estos materiales fueron fosilizados por material piroclástico edificado de ceniza volcánica, delimitándose hacia el norte del río Guano y su conjunto de formas aluviales la planicie de Tapi, mientras que hacia el sur limita un sistema de terraza de acción fluvial del río Chambo.

2.2.1.3. Climatología

El clima de la ciudad de Riobamba pertenece al piso climático templado interandino al ubicarse en una franja altitudinal de 2754 m.s.n.m.

El clima imperante es el mesotérmico húmedo a semihúmedo pudiéndose establecer dos periodos el verano, de agosto a enero, con vientos fuertes, sol intenso durante el día y frío durante las noches y el invierno, de febrero a julio, con temporada lluviosa.

2.2.1.4 Temperatura

En el año 2014 se registra una temperatura media anual de 14,8 °C, con una temperatura máxima anual de 19,6 °C y mínima anual de 8,8 °C, con una variación mensual de que varía desde los 11,9 °C hasta 22,9 °C.

Tabla 1-2: Temperatura Mensual de Riobamba-Año 2014

MES	TEMPERATURA °C		
	MÁXIMA	MÍNIMA	MEDIA
ENERO	21,9	9,4	14,2
FEBRERO	21,5	9,8	14,3
MARZO	21,1	9,6	13,8
ABRIL	20,9	9,5	13,6
MAYO	20,5	9,6	13,6
JUNIO	19,6	8,2	12,5
JULIO	20,3	7,5	12,6
AGOSTO	19,7	7,6	11,9
SEPTIEMBRE	20,4	7,3	12,8
OCTUBRE	21,5	8,8	13,5
NOVIEMBRE	14,4	9,1	22,9
DICIEMBRE	13,6	8,9	22,0
PROMEDIO	19,6	8,8	14,8

Realizado por: Flores, A. 2015

Fuente: Estación Meteorológica-ESPOCH

2.2.1.5 Hidrología

Riobamba se encuentra ubicada en la cuenca del río Pastaza, subcuenca del río Chambo y microcuenca del río Chibunga.

Las principales corriente hídricas nacen en las flancos de las cordilleras; son de corto recorrido y correntosos, entre los que se destacan: Alao, Blanco, Calera, Chimborazo, Chibunga, Chiniloma, Chambo, Collantes, Cuychi, Daldal, Guano y otros de menor cauce Ganquis, Guargualla, Ishpi, Maguaso, Paylacajas, Quilimas, Taullín, Tiaco Chico, Tiaco Grande, Tililag, Shayhua y Zanampala.

2.2.1.6 Precipitación

En el año 2014, se registran tres épocas lluviosas, la primera es el mes de enero, la segunda desde el mes de marzo y culmina en junio, y una tercera se registra de septiembre a diciembre.

El mes con mayor precipitación es mayo con un valor de 89,4 mm Hg. Por otro lado, los meses secos corresponden a febrero y al periodo entre julio y agosto.

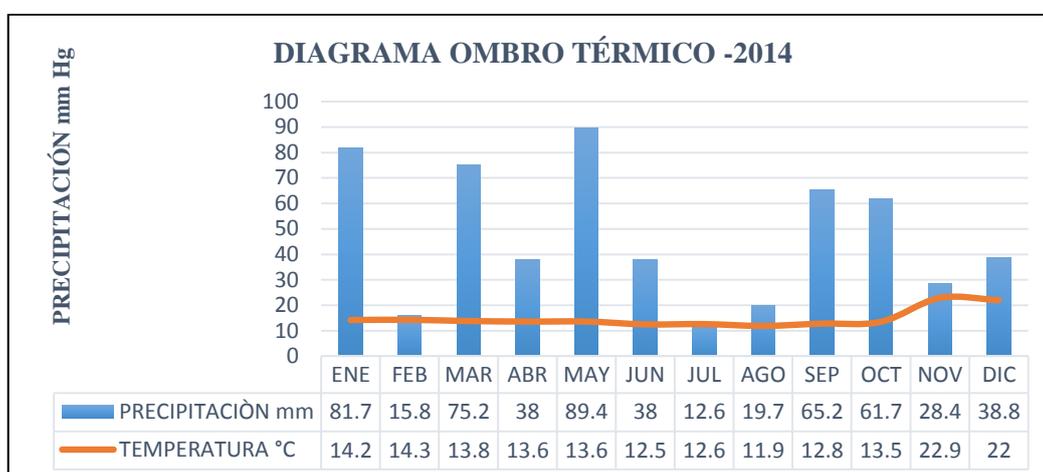


Gráfico 1-2: Diagrama Ombrotérmico-Riobamba 2014.

Realizado por: Flores, A. 2015

Fuente: Estación Meteorológica-ESPOCH

2.2.1.7 Heliofanía

En el 2014 se registra 1834,6 horas de sol, con una media 152,9 horas/mes y un valor de 4,9 h/día.

Tabla 2-2: Heliofanía de Riobamba

MES	HELIOFANÍA	
	HORAS DE SOL	PORCENTAJE
ENERO	179,5	48,1
FEBRERO	149,0	44,4
MARZO	106,0	30,3
ABRIL	135,8	37,6
MAYO	144,6	41,4
JUNIO	136,3	40,5
JULIO	187,5	50,4
AGOSTO	129,8	43,2
SEPTIEMBRE	145,3	46,5
OCTUBRE	174,9	47,0
NOVIEMBRE	169,9	47,1
DICIEMBRE	176,0	47,0
Σ	1834,6	43,6

Realizado por: Flores, A. 2015

Fuente: Estación Meteorológica-ESPOCH

2.2.1.8 Humedad Relativa

La concentración de humedad en la atmosfera registra un valor promedio mensual de 62%, presentando un valor máximo de 95,4% en el mes de diciembre y 24,4% en el mes de julio como valor mínimo.

Tabla 3-2: Humedad Relativa de Riobamba

MES	HÚMEDAD RELATIVA %		
	MÀXIMA	MINIMA	MEDIA
ENERO	92,1	24,8	63,3
FEBRERO	91,5	26,0	62,5
MARZO	92,0	27,4	66,4
ABRIL	91,3	28,0	64,6
MAYO	90,8	30,0	66,4
JUNIO	90,9	30,0	65,3
JULIO	90,4	24,4	59,7
AGOSTO	91,6	26,3	60,7
SEPTIEMBRE	87,6	22,6	55,4
OCTUBRE	87,9	24,2	60,4
NOVIEMBRE	88,6	22,2	58,3
DICIEMBRE	95,4	40,7	73,6
PROMEDIO			62,0

Realizado por: Flores, A. 2015

Fuente: Estación Meteorológica-ESPOCH

2.2.1.9 Velocidad y dirección del viento

En el año 2014, la velocidad del viento media anual fue de 2,1 m/s, con una intensidad media que oscila entre 1,8 y 2,5 m/s, en los meses de mayo y julio respectivamente. Además, la dirección del viento predominante en el año es el sentido sureste.

Tabla 4-2: Velocidad y Dirección del Viento

MES	VIENTO	
	VELOCIDAD (m/s)	DIRECCIÓN
ENERO	2,0	SE
FEBRERO	2,1	SE
MARZO	1,9	SE
ABRIL	2,1	SE
MAYO	1,8	SE
JUNIO	2,1	SE
JULIO	2,5	SE
AGOSTO	2,2	SE
SEPTIEMBRE	2,2	SE
OCTUBRE	2,0	SE
NOVIEMBRE	1,9	SE
DICIEMBRE	2,1	SE
PROMEDIO	2,1	SE

Realizado por: Flores, A. 2015

Fuente: Estación Meteorológica-ESPOCH

2.2.2 Flora

Un factor importante es la determinación de la especies florísticas de la laguna, por lo que, mediante la técnica de observación in situ y la recopilación de datos, se determinó la presencia de las siguientes especies:

Tabla 5-2: Flora Laguna de San Antonio.

Nombre Común	Imagen	Familia	Género	Especie
Marco		Asteraceae	<i>Ambrosia</i>	<i>arborescens</i>
Taraxaco		Asteraceae	<i>Taraxacum</i>	<i>officinale</i>
Chilca		Asteraceae	<i>Baccharis</i>	<i>latifolia</i>
Totora		Cyperaceae	<i>Scirpus</i>	<i>californicus</i>
Calabaza		Cucurbitaceae	<i>Cucurbita</i>	<i>sp1</i>
Pungal		Solanaceae	<i>Solanum</i>	<i>crinitipes</i>

Hierba mora		Solanaceae	<i>Solanum</i>	<i>nigrescens</i>
Uvilla		Solanaceae	<i>Physalis</i>	<i>peruviana</i>
Sigse		Poaceae	<i>Cortaderia</i>	<i>nitida</i>
Mora		Rosaceae	<i>Rubus</i>	<i>adenotrichos</i>
Capulí		Rosaceae	<i>Prunus</i>	<i>serotina</i>
Sauce		Salicaceae	<i>Salix</i>	<i>sp1</i>
Penco		Agavaceae	<i>Agave</i>	<i>sp1</i>

Menta		Lamiaceae	<i>Mentha</i>	<i>sp1</i>
Trébol		Fabaceae	<i>Trifolium</i>	<i>sp1</i>
Maíz		Poaceae	<i>Zea</i>	<i>mays</i>

Realizado por: Flores, A. 2015

Fuente: SIERRA, R.2009

2.2.3 Fauna

2.2.3.1 Avifauna

Tabla 6-2: Avifauna Laguna de San Antonio.

Nombre Común	Imagen	Familia	Genero	Especie
Chingolo		Emberizadae	<i>Zonotrichia</i>	<i>capensis</i>
Quilico		Falconidae	<i>Falco</i>	<i>sparverius</i>

Mirlo		Turdidae	<i>Turdus</i>	<i>fuscater</i>
Paloma		Columbidae	<i>Columba</i>	<i>livia</i>
Pájaro brujo		Tyrannidae	<i>Pyrocephalus</i>	<i>rubinus</i>
Garcita estriada		Ardeidae	<i>Butorides</i>	<i>striata</i>
Tórtola		Caprimulgidae	<i>Zenaida</i>	<i>auriculata</i>
Vencejos		Apodidae	<i>Streptoprocne</i>	<i>sp1</i>
Colibrí		Trochilidae	<i>Colibri</i>	<i>coruscans</i>

Colibrí colilargo		Trochilidae	<i>Lesbia</i>	<i>victoriae</i>
Jilguero		Fringilidae	<i>Carduelis</i>	<i>sp1</i>
Huirac-churo		Cardinalidae	<i>Pheucticus</i>	<i>chrysogaster</i>

Realizado por: Flores, A. 2015

Fuente: SIERRA, R.2009

2.2.3.2 Mastofauna

Tabla 7-2: Mastofauna Laguna de San Antonio.

Nombre Común	Imagen	Familia	Genero	Especie
Perro		Canidae	<i>Canis</i>	<i>lupus familiaris</i>
Vaca		Bovidae	<i>Bos</i>	<i>taurus</i>

Realizado por: Flores, A. 2015

Fuente: SIERRA, R.2009

2.2.3.3 Herpetofauna

Tabla 8-2: Herpetofauna Laguna de San Antonio.

Nombre Común	Imagen	Familia	Genero	Especie
Lagartija		Dactyloidae	<i>Anolis</i>	sp1
Rana marsupial		Amphignathodontidae	<i>Gastrotheca</i>	<i>riobambae</i>

Realizado por: Flores, A. 2015

Fuente: SIERRA, R.2009

2.3 Materiales experimentales

2.3.1 Área experimental

La instalación de las biopilas de biolixiviación y su monitoreo se desarrolló en el laboratorio de biotecnología de la Facultad de Ciencias de la ciudad de Riobamba, donde se colocó unas cajas de plástico con una pendiente de 5° con el fin de que no exista impermeabilización y el lixiviado pueda fluir.

2.3.2 Materiales y equipos

Los materiales y equipos utilizados en el desarrollo del estudio son del Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental (CESTTA), los mismos que se detalla en la siguiente tabla 9-2.

Tabla 9-2: Materiales Experimentales

FASE DE LA INVESTIGACIÓN	MATERIALES	CANTIDAD
Muestreo de sedimento de la laguna	Guantes látex (par)	10
	Bolsas Zyploc	40
	Cooler	1
	Slinga	1
	Draga	1
	Frascos estériles	100
	Hisopos	10
Instalación de las pilas de biolixiviación	Cajas plásticas de 30cmx30cm	3
	Balanza	1
	Papel aluminio	2
	Frascos estériles	6

Realizado por: Flores, A. 2015

Tabla 10-2: Equipos Experimentales

FASE DE LA INVESTIGACIÓN	EQUIPOS	CANTIDAD
Análisis físico-químico del sedimento	Digestor	1
	Inducción Acoplada de Plasma (ICP)	1
	Termómetro	1
	pH-metro	1
	Balanza de Humedad	
Análisis Microbiológico	Cámara de flujo laminar	1
	Balanza Analítica	1
	Agitador magnético	1
	Autoclave	1

Realizado por: Flores, A. 2015

2.3.3 *Técnicas de muestreo*

Se aplica un muestreo no probabilístico, específicamente la muestra fue seleccionada aplicando el método de conveniencia, por la existencia de los metales Ba, Cu y V en el objeto de estudio.

La metodología de toma de muestras de sedimentos se realizó siguiendo el procedimiento de toma y conservación de muestras de suelos/sedimentos basado en Environmental Protection Agency (EPA) Preparation of Soil Sampling Protocols: Sampling Techniques and Strategies. EPA/600/R-92/128.

Considerando un área de muestreo de 36 m², se estableció un trazo en forma de X alrededor del punto de muestreo, tomando muestras hacia el fondo de la laguna en un total de 24 puntos en total, mediante una draga de muestreo tipo Van Veen.

Posteriormente se homogenizó el sedimento y se colocó en bolsas zyploc estériles para su traslado en refrigeración. De igual forma se realizó el muestreo para colocar el sedimento en las pilas de biolixiviación en el área experimental.

2.4 Diseño experimental

El presente estudio está sujeto a la manipulación de variables, enfocado principalmente en la actividad simbiótica de los consorcios microbianos y sus variables de control (pH, temperatura óptima de crecimiento, humedad, cantidad de nutrientes).

2.4.1 Tipo de diseño

Las características del tipo de investigación se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 11-2: Características de la investigación

Característica	Tipo
Nivel	Descriptivo
Secuencia	Transversal
Enfoque	Cuantitativo
Conocimiento	Aplicativo
Método	Experimental

Realizado por: Flores, A. 2015

Por lo tanto se plantea un diseño de cronologías múltiples, con la selección no aleatoria de sujetos en la que se denota:

G₁ O₁ - O₂

G₂ O₁ X₁ O₂

G₃ O₁ X₂ O₂

Dónde:

G₁G₂ G₃: Grupos experimentales de sedimentos.

(-) = Sin inóculos bacterianos nativos

O₁: Análisis físico químico y microbiológico del sedimento contaminado antes de la inoculación.

O₂: Análisis físico químico y microbiológico del sedimento contaminado después de la inoculación.

X = Tratamiento; aplicación de los consorcios bacterianos y fúngicos nativos en el sedimento contaminado.

2.4.2 Tratamientos

El sedimento contaminado proveniente de la Laguna de San Antonio de Padua tiene un peso de 15 Kg distribuidos equitativamente en 3 cubetas plásticas, los tratamientos son:

TB=Sedimento contaminado inoculado con consorcios bacteriano nativos.

TF=Sedimento contaminado inoculado con consorcio fúngicos nativos

2.4.3 Variables de control

Durante el proceso de biolixiviación, es importante el control de los siguientes parámetros, ya que garantiza que las cepas bacterianas o fúngicas se encuentren en condiciones adecuadas para su crecimiento:

- Temperatura
- pH
- Humedad
- Crecimiento bacteriano
- Crecimiento fúngico

CAPITULO III

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Procesamiento de muestras biológicas

Las especies fúngicas presentes en las muestras de sedimentos de la Laguna de San Antonio requieren nutrientes básicos aportados por los medios de cultivo no selectivos como es el caldo nutritivo.

3.1.1 *Materiales equipos y reactivos*

- Cámara de flujo laminar
- Autoclave
- Incubadora
- Balanza analítica
- Lámpara de alcohol
- Frascos y tubos de vidrio con tapa rosca
- Cajas petri de vidrio o plástico
- Gradilla
- Cinta Petrifilm
- Frascos plásticos
- Asa bacteriológica
- Pipeta automática
- Agua de peptona
- Agar nutritivo Saboraud
- Agar nutritivo PDA(Patata Dextrosa Agar)

3.1.2 Procedimiento

- a. Preparar la cantidad necesaria de agua de peptona, distribuirla en frascos y tubos de acuerdo al número de diluciones y esterilizar en el autoclave.
- b. Preparar agar nutritivo PDA o Saboraud, añadiendo un inhibidor de crecimiento bacteriano (cloranfenicol) esterilizar en el autoclave, colocar en cajas petri y dejar solidificar.
- c. Homogenizar la muestra de sedimento, pesar la cantidad necesaria y colocar en el agua de peptona estéril.
- d. Tomar una alícuota de la primera dilución y transferir al tubo de la segunda dilución. Realizar este proceso hasta completar el número de diluciones deseadas
- e. Colocar una alícuota de las diluciones en cada una de las cajas petri y con el asa bacteriológica esparcir sobre la superficie del agar.
- f. Incubar a 27°C, a partir del quinto día se observa crecimiento.



Ilustración 1-3: Preparación de cajas con agar
Realizado por: FLORES, A. 2015

3.2 Aislamiento y purificación de las cepas fúngicas

Un proceso de aislamiento consecutivo permite obtener las cepas fúngicas en estado puro, aptas para el proceso de biolixiviación

3.2.1 Materiales equipos y reactivos

- Cámara de flujo laminar
- Autoclave
- Incubadora

- Balanza analítica
- Sacabocados
- Aguja de tungsteno
- Cajas petri de vidrio o plástico
- Cinta petrifilm
- Frascos plásticos
- Asa bacteriológica
- Lámpara de alcohol
- Agar nutritivo Saboraud
- Agar nutritivo PDA(Patata Dextrosa Agar)

3.2.2 Procedimiento

- Preparamos el agar nutritivo, esterilizamos en el autoclave y distribuimos en cajas petri hasta su solidificación.
- Con el sacabocados extraemos una porción del hongo y sembramos en el medio de cultivo. Repetimos el proceso hasta obtener el crecimiento de la cepa pura.
- Verificamos que no haya invasión de otra especie.



Ilustración 2-3: Aislamiento y purificación de cepas
Realizado por: FLORES, A. 2015

3.3 Identificación y caracterización de las cepas fúngicas.

La identificación y caracterización permite determinar las características morfológicas de las cepas que vayan a conformar el consorcio fúngico. Se realiza una resiembra mensualmente para la conservación de las cepas y evitar el envejecimiento.

3.3.1 *Materiales equipos y reactivos*

- Microscopio
- Porta objetos
- Azul de Lactofenol
- Alcohol etílico
- Cinta pegante
- Lámpara de alcohol
- Base de datos.

3.3.2 *Procedimiento*

- a. Adicionamos los reactivos de tinción sobre la porta objetos.
- b. Extraemos una porción de la cepa fúngica con la cinta pegante y la colocamos en la porta objetos.
- c. Observamos las características microscópicas de la cepa fúngica con ayuda de los diferentes lentes y la comparamos con la base de datos.
- d. Registramos las características macroscópicas observadas, a lo largo del crecimiento del hongo.

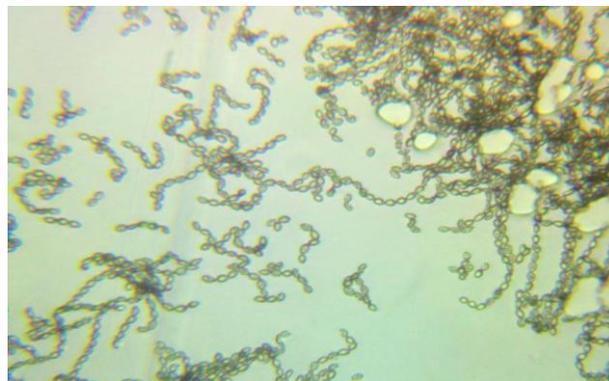


Ilustración 3-3: Observación de placas al microscopio
Realizado por: FLORES, A. 2015

3.4 **Conservación de cepas fúngicas**

La conformación de un banco primario, permite conservar las cepas por largos periodos de tiempo.

3.4.1 *Materiales, equipos y reactivos*

- Puntas esteriles
- Mechero de alcohol
- Micro pipeta
- Sacabocados
- Tubos eppendorf
- Solución de glicerol al 20%
- Autoclave
- Congelador.

3.4.2 *Procedimiento*

- a. Preparamos una solución de glicerol al 20% y esterilizamos junto con los tubos eppendorf.
- b. Distribuir la solución en los tubos.
- c. Con el sacabocados extraemos parte del hongo y colocamos en el tubo.
- d. Mantener en congelación.



Ilustración 4-3: Conservación de cepas fúngicas
Realizado por: FLORES, A. 2015

3.5 Preparación del inóculo líquido fúngico

El inóculo líquido sirve para que las hifas ejerzan mayor acción con una sola aplicación.

3.5.1 *Materiales, equipos y reactivos*

- Afrecho de trigo
- Cepas fúngicas
- Sacabocados
- Frascos de vidrio con tapa rosca
- Agitador mecánico
- Autoclave

3.5.2 *Procedimiento*

- a. Preparamos una solución de afrecho de trigo con agua destilada y esterilizamos.
- b. Con el sacabocados extraemos una porción de las cepas fúngicas y lo colocamos en la solución estéril de trigo, que será la única fuente de carbono para los hongos.
- c. Agitamos constantemente hasta observar la formación de conglomerados blancos.



Ilustración 5-3: Preparación inoculo líquido fúngico
Realizado por: FLORES, A. 2015

3.6 **Reactivación de cepas bacterianas**

Contribuye a que el inoculo este conformado por bacterias activas.

3.6.1 *Materiales equipos y reactivos*

- Matraces de 100 ml
- Tubos de vidrio con tapa rosca
- Lámpara de alcohol.
- Cámara de flujo laminar
- Autoclave
- Incubadora
- Pipeta automática
- Caldo nutritivo
- Cepas bacterianas

3.6.2 *Procedimiento*

- a. Preparar la cantidad necesaria de caldo nutritivo y distribuirla en cada uno de los tubos.
- b. Añadir las cepas bacterianas en el caldo nutritivo.
- c. Incubar a 35°C
- d. Verificamos el crecimiento por la turbidez formada en el caldo nutritivo que contienen los tubos.



Ilustración 6-3: Reactivación de cepas bacterianas
Realizado por: FLORES, A.2015

3.7 Preparación del inóculo líquido bacteriano

3.7.1 *Materiales, equipos y reactivos*

- Matraces de 500 ml.
- Motores de pecera.
- $MgSO_4$
- NaCl.
- NH_4Cl
- KH_2PO_4
- Peptona
- Azúcar.
- Gelatina si sabor
- Agua destilada
- Cepas bacterianas

3.7.2 *Procedimiento*

- a. Pesamos la cantidad necesaria de cada uno de los reactivos y lo colocamos en el agua destilada.
- b. Añadimos las cepas bacterianas reactivadas.
- c. Mantener en aireación por el lapso de 48 horas.
- d. Inocular en el sedimento.



Ilustración 7-3: Preparación inóculo líquido bacteriano
Realizado por: FLORES, A. 2015

3.8 Métodos analíticos

3.8.1 *Determinación de metales pesados*

Principio

El plasma acoplado inductivamente consiste en la vaporización, disociación y excitación de elementos químicos, en la que el gas argón transporta un aerosol acoplado por radio frecuencia; las temperaturas elevadas ocasionan que los analitos sean atomizados y ionizados generándose el espectro de emisión característico.

Equipo utilizado

ICP.

Referencia

Método de Referencia: EPA 3050B-3051/6010B

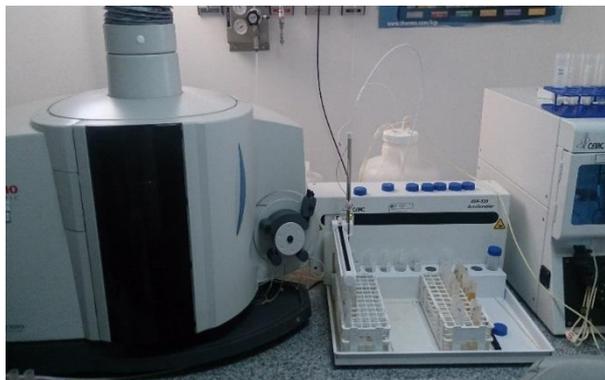


Ilustración 8-3: Inducción Acoplada de Plasma
Realizado por: FLORES, A. 2015

3.8.2 *Determinación de pH.*

Principio

La concentración de iones hidrogeno está relacionada directamente con el grado de acidez o alcalinidad, en la que un electrodo de vidrio detecta el potencial eléctrico en milivolts (mV) y en unidades de pH.

Cabe recalcar, que el pH de un sedimento representa aspectos del clima, vegetación e hidrología del lugar donde se ha formado.

Equipo utilizado

Potenciómetro

Referencia

Método de Referencia: EPA 9045 D.2004

3.8.3 *Determinación de humedad*

Principio

La cantidad de agua presente en el sedimento, se basa en la pérdida de peso de la muestra por calentamiento en una balanza de humedad, la relación gravimétrica determina el contenido de humedad en porcentaje.

Equipo utilizado

Balanza de humedad.

Referencia

Protocolo interno de ensayo (CESTTA).

3.8.4 *Determinación de temperatura*

Principio

La energía en movimiento de los átomos de una sustancia, genera una energía térmica cuantificable en función del movimiento medio, factor independiente del tamaño de las partículas.

Equipo utilizado

Termómetro

3.9 Métodos microbiológicos

3.9.1 *Determinación de concentración bacteriana*

Se determina mediante la preparación de una serie de diluciones sucesivas en un medio nutritivo básico, siembra en placas petrifilm y posterior conteo.

3.9.2 *Determinación de presencia de cepas fúngicas.*

La determinación de la presencia de hongos se realiza mediante la preparación de una serie de diluciones sucesivas en un medio nutritivo básico, siembra en cajas petri con agar selectivo y verificación de crecimiento.

CAPITULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Análisis físico-químico del sedimento

Los resultados del análisis físico químico, nos indican la presencia de Ba, Cu y V en los sedimentos de la Laguna de San Antonio de Padua.

Tabla 1-4: Caracterización Físico Química del Sedimento

PARÁMETROS	UNIDAD	RESULTADO	INCERTIDUMBRE
Hidrocarburos Totales	mg/Kg	84,83	±26%
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos	mg/Kg	< 0,3	±30%
*Bario	mg/Kg	154,15	-
*Vanadio	mg/Kg	38,66	-
*Cobre	mg/Kg	51,45	-
*Nitrógeno Total	%	0,14	-
*Fósforo Total	mg/Kg	195,43	-
*Potasio	mg/Kg	1551,50	-
Potencial de Hidrógeno	Unidades de pH	7,44	±0,15
*Humedad	%	39	-

Realizado por: FLORES, A. 2015.

Fuente: LAB-CESTTA

4.2 Identificación de cepas bacterianas

CAZORLA, E. en la investigación titulada “Obtención del Consorcio Bacteriano Nativo del Sedimento de la Laguna de San Antonio del Cantón Riobamba, en la prueba de identificación obtiene las siguientes bacterias:

Tabla 2-4: Cepas Bacterianas de la Laguna de San Antonio

CÓDIGO DE LA CEPA	NOMBRE CIENTÍFICO	FORMA CELULAR	GRAM
L3	<i>Xenorhabdus nematophilys</i>	<i>Bacilos pequeños</i>	-
L4	<i>Xenorhabdus nematophilys</i>	<i>Bacilos pequeños</i>	-
L5	<i>Xenorhabdus nematophilys</i>	<i>Bacilos pequeños</i>	-
L7	<i>Xenorhabdus nematophilys</i>	<i>Bacilos pequeños</i>	-
L9	<i>E. coli – inactiva</i>	<i>Bacilos grandes</i>	-
L10	<i>Xenorhabdus nematophilys</i>	<i>Bacilos pequeños</i>	-
L12	<i>E. coli – inactiva</i>	<i>Bacilos grandes</i>	-

Realizado por: FLORES, A. 2015.

Fuente: CAZORLA, E. 2014

Las cepas bacterianas muestran resultado negativo a la tinción de gram, por lo que, mediante pruebas de selección y aptitud, las cepas L3, L4, L5, L7, L9, L10 y L12 son las que forman parte del consorcio bacteriano nativo.

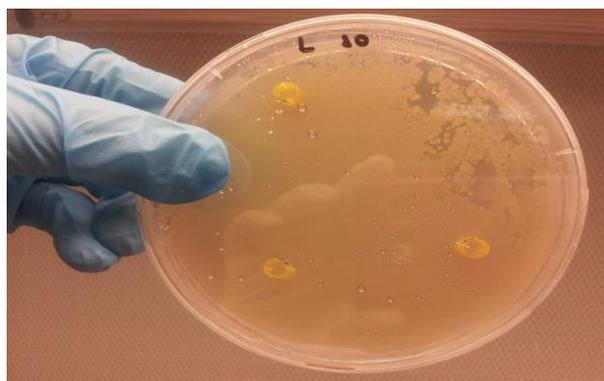


Ilustración 1-4: Cepa bacteriana nativa

Realizado por: FLORES, A. 2015

Fuente: CAZORLA, E.2014

4.3 Identificación de cepas fúngicas

La prueba de identificación de las cepas fúngicas se realizó aplicando la técnica de la cinta pegante, conservando la yuxtaposición original de esporas y segmentos hifales, de esta manera se observa las características microscópicas de las colonias sin alteración.

La ayuda de un experto y la comparación con base de datos, permitió determinar el género de la cepa fúngica.

Se obtuvieron un total de 8 cepas puras, las cuales en su mayoría son filamentosas de crecimiento rápido. Además la mayoría de estas cepas presentan esporulación por conidióforos como parte de su ciclo reproductivo normal.

Dentro de las especies fúngicas encontradas, se pudo identificar el género y especie de una las cepas, la misma que corresponde al *Aspergillus niger*, fácilmente identificable.

Además, el género *Penicillium* produce un cambio de coloración en el agar, la razón puede ser la producción de antibióticos de la cepa.

En la 3-4 tabla se describe el código de la cepa fúngica, el género y sus características morfológicas.

Tabla 3-4: Características macroscópicas y microscópicas de cepas fúngicas

CÓDIGO	GENERO	COLOR DE LA COLONIA	CRECIMIENTO	FORMA CELULAR	ESPORULACIÓN	HIFAS
LSA-A	Xylohypha	Centro: Negro Borde: Gris oscuro	Rápido	Filamentosa	Conidióforos	Septadas Hialinas
LSA-B	Aspergillus	Centro: Negro Borde: Amarillo			Ascosporas Conidióforos	Tabicular
LSA-C	Aspergillus	Centro: Negro grisáceo Borde: Negro			Tabicular	
LSA-D	Trichoderma	Centro: Verde Borde: Amarillo Verdoso			Septada	
LSA-E	Trichoderma	Centro: Verde Borde: Blanco verdoso			Septada	
LSA-F	Penicillium	Centro: Amarillo verdoso Borde: Blanco			Septadas Hialinas	
LSA-G	Cladosporium	Centro: Marrón Borde: Negro	Lento		Conidióforos	Tabicular
LSA-H	Humícola	Blanco	Rápido		Conidióforos	Hialinas

Realizado por: FLORES, A. 2015

4.4 Prueba de biolixiviación de metales

4.4.1 Inoculo bacteriano y fúngico

El consorcio bacteriano utilizado está formado por la especie nativa *Xenorhabdus nematophilys* y el consorcio fúngico está conformado por ocho cepas de hongos pertenecientes a 6 géneros: *Xylohypha*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Cladosporium* y *Humicola*.

Se acondiciono el medio, con la adición de urea nutriente esencial para los microorganismos y aserrín ya que mejora la textura del sedimento y mayor fluidez del lixiviado.

4.4.2 Biolixiviación en pilas.

Para verificar la capacidad de biolixiviar metales pesados se inocula los consorcios en las pilas de biolixiviación por un lapso de 77 días y se deja liberar el metal por la actividad simbiótica natural del consorcio.

Verificamos la capacidad que tienen los consorcios de biolixiviar ciertos metales pesados mediante una prueba de liberación de metales, es decir, medir la concentración del metal en el lixiviado liberado de la fracción insoluble (sedimento), medimos de forma semanal el volumen de biolixiviado a partir de la segunda semana de inoculación.



Ilustración 2-4: Pilas de biolixiviación
Realizado por: FLORES, A. 2015

4.5 Análisis de datos experimentales

4.5.1. *Obtención del sedimento sujeto a biolixiviación*

La población total (N) a estudiar fue de 15 Kg de sedimento obtenido de la Laguna de San Antonio, el sedimento fue homogenizado para el proceso de biolixiviación y distribuido en cantidades iguales en los dos tratamientos y en el grupo control.

4.5.2. *Caracterización y parámetros de análisis del sedimento*

Para la caracterización físico química del sedimento en cada uno de los tratamientos se tomó en cuenta los siguientes parámetros, Hidrocarburos Totales de Petróleo (THP), metales (Ba) Bario, (Cu) Cobre y (V) Vanadio, nutrientes, (N) Nitrógeno, (P) Fosforo y (K) Potasio, además del grado de acidez o alcalinidad y el contenido de humedad.

Los parámetros de control pH, humedad, y temperatura se midió dos veces por semana, la carga bacteriana y fúngica se determinó inicialmente y posterior a la inoculación durante todo el proceso de biolixiviación

4.5.3 *Análisis de unidades de control*

La caracterización química de los metales de interés se ve reflejada en la tabla 4-4, concentración estándar de los dos grupos experimentales.

No existe una normativa específica que señale los límites permisibles de metales en sedimentos lacustres, por cuanto, la eficacia se determina en función de la concentración del metal en el lixiviado.

Tabla 4-4: Concentración Inicial de Metales en los Sedimentos

Parámetros	Concentración(mg/Kg)
Ba	154,15
V	38,66
Cu	51,45

Realizado por: FLORES, A. 2015

En el gráfico 1-4 se puede observar el volumen de lixiviación obtenido de cada uno de los tratamientos.

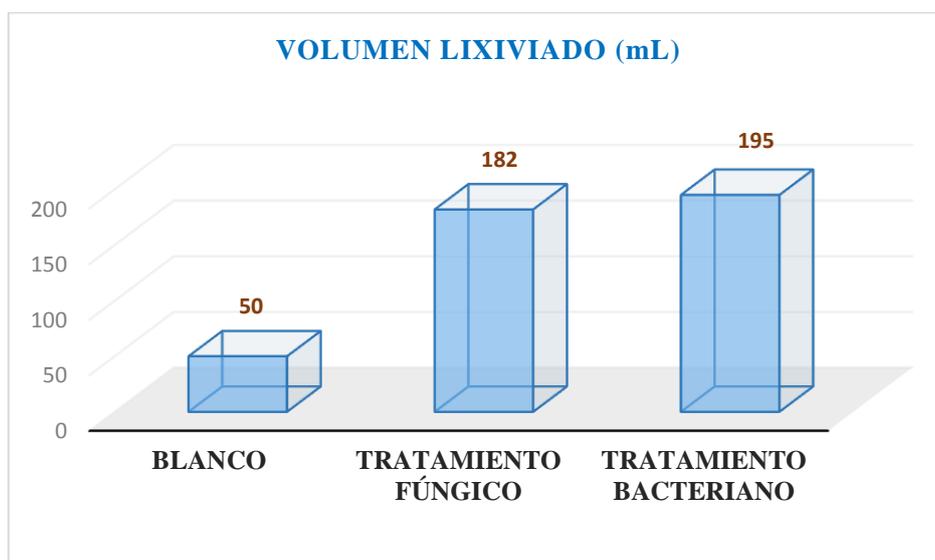


Gráfico 1-4: Volumen de lixiviación

Realizado por: FLORES, A. 2015

Se determinó la concentración de los metales en el lixiviado a los 77 días que duró el proceso de biolixiviación para cada uno de los tratamientos aplicados tal como se observa en la tabla 5-4.

Tabla 5-4: Concentración de metales en el lixiviado.

Parámetro	Concentración A (ppm) TB	Concentración B (ppm) TH
Ba	3,96	1,683
V	0,0448	0,1119
Cu	0,0585	0,0579

Realizado por: FLORES, A. 2015

4.6 Seguimiento de variables de control

4.6.1 Temperatura y humedad en proceso de biolixiviación

Se registró el control de la humedad y temperatura durante 77 días que duró del proceso de biolixiviación.

La temperatura en las unidades experimentales como se observa en el Grafico 2-4. Variación de Temperatura de las Unidades Experimentales, el GC inicia con una temperatura de 18,68 °C; el TB inicia con 19,3 °C y el TF con 19,07 °C, la temperatura va aumentando gradualmente en cada una de las unidades experimentales conforme la inoculación en cada tratamiento.

La temperatura máxima registrada es de 20,03 °C en el GC, 20,78 °C en el TB y de 20 °C en el TF.

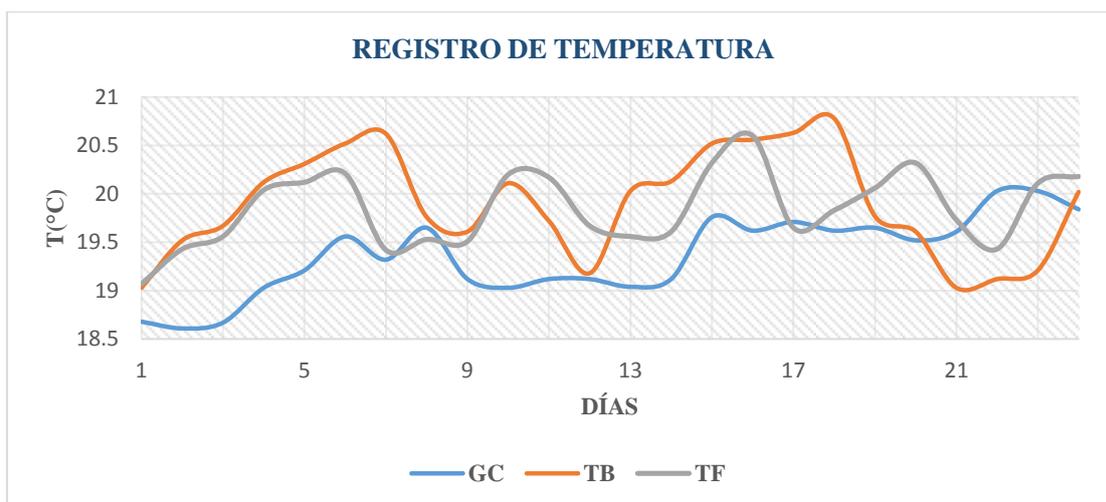


Gráfico 2-4: Variación de Temperatura de las Unidades Experimentales

Realizado por: FLORES, A. 2015

La humedad en las unidades experimentales presenta valores entre 53,10 % a 69,2 %, manteniéndose dentro de este rango durante el proceso de biolixiviación.

La media de humedad es de 54,50 % en el GC, 64,42 % en el TB y 64,82 % en el TF. El valor máximo alcanzado es de 69,2 % registrado en el TF, como se observa en el gráfico 3-4 Variación de Humedad en unidades experimentales.

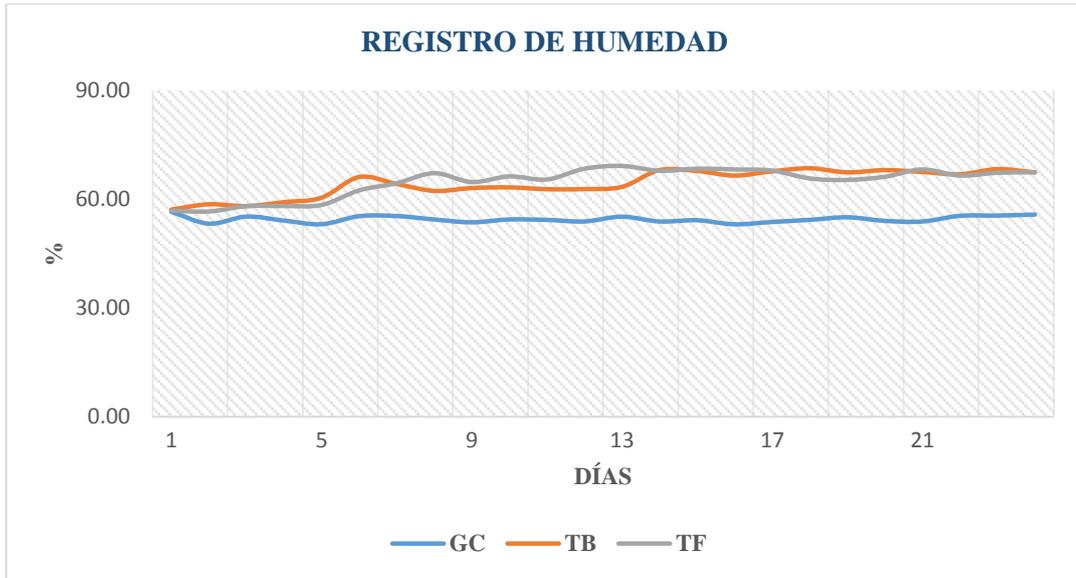


Gráfico 3-4: Variación de Humedad de las Unidades Experimentales
 Realizado por: FLORES, A. 2015

4.6.2 pH en proceso de biolixiviación

El pH del sedimento fluctúa entre 7,32 y 7,87 unidades de pH, manteniéndose neutro en las unidades experimentales durante el proceso de biolixiviación.

El pH en el TF presenta una media de 7,74 próximo a un estado básico, como se evidencia en Gráfico 4-4. Variación de pH de las Unidades Experimentales.

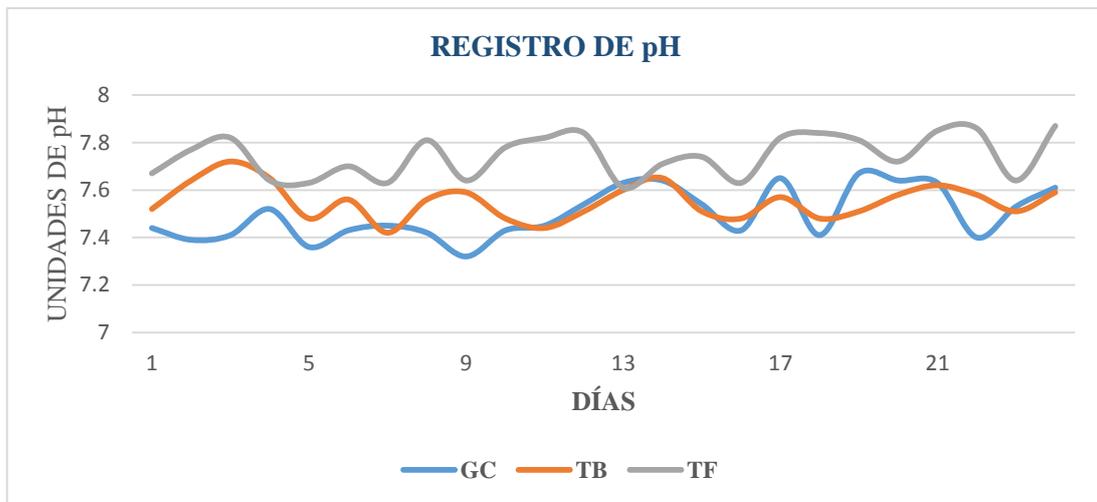


Gráfico 4-4: Variación de pH de las Unidades Experimentales
 Realizado por: FLORES, A. 2015

4.6.3. Carga bacteriana

Se realizó un conteo inicial de bacterias, comprobando la presencia de colonias en el sedimento antes de inocular, (Ver Tabla 6-4).

Se cuantifico mediante el uso de placas petri film, cuyo principio se basa en la siguiente ecuación $UFC\ g\ sedimento = N \times FD \times Vt/Vi \times S$, donde N es Numero de colonias, FD es Factor de dilución, Vt es Volumen de dilución (10 mL), Vi es Volumen inoculado en mL y S es Cantidad de sedimento utilizado para la siembra, (Ver Anexo A).

Tabla 6-4. Registro Inicial de UFC en el Sedimento

	DILUCIONES		
	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
GC	128	82	51
TB	141	96	49

Realizado por: FLORES, A. 2015.

La masificación del consorcio bacteriano permitió determinar una mayor concentración de flora bacteriana nativa, como se evidencia al comparar con el GC (Ver Tabla 7-4).

Tabla 7-4: Registro de UFC Posterior a la Inoculación Bacteriana

	DILUCIONES		
	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
GC	134	85	56
TB	INCONTABLE	INCONTABLE	86

Realizado por: FLORES, A. 2015.

4.6.4 Carga fúngica

Se cuantifico mediante el uso de placas petri film MR, medio específico para hongos filamentosos, determinando la carga fúngica antes de inocular el consorcio fúngico.

Tabla 8-4. Registro Inicial de UFC en el Sedimento

	DILUCIONES		
	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
GC	29	17	9
TH	22	14	6

Realizado por: FLORES, A. 2015.

Se evidencio un aumento de la carga fúngica nativa en los grupos experimentales (Ver Tabla 9-4), de esta forma se determina una adecuada masificación del consorcio fúngico frente al grupo control.

Tabla 9-4: Registro de UFC Posterior a la Inoculación de Hongos

	DILUCIONES		
	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
GC	27	13	7
TH	31	19	13

Realizado por: FLORES, A. 2015

4.7 Eficacia del proceso de biolixiviación.

La eficacia de los consorcios bacterianos y fúngicos, se determina mediante una serie de pruebas y comprobación de hipótesis aplicando el software R-Commander, que facilita mayor confiabilidad en el análisis estadístico de datos.

Tabla 10-4: Registro de Concentración de Metales

N°	T_METAL	TRAT	F_BLOQUE	C_ANTES	C_DESPUES
1	Ba	C	A	154,15	1,42
2	V	C	A	38,66	0,5355
3	Cu	C	A	51,45	0,0485
4	Ba	B	A	154,15	3,96
5	V	B	A	38,66	0,0448
6	Cu	B	A	51,45	0,0585
7	Ba	H	A	154,15	1,683
8	V	H	A	38,66	0,1119
9	Cu	H	A	51,45	0,0579

Realizado por: FLORES, A. 2015.

4.7.1 *Influencia de los consorcios bacteriano y fúngico*

Se analizó la eficacia de los consorcios bacterianos y fúngicos mediante la concentración contenida en el lixiviado, con la finalidad de validar su acción durante el tiempo de monitoreo. Para lo cual se aplicó la prueba de Wilcoxon con un nivel de significancia de 0.05.

Hipótesis

H_0 : Los consorcios bacterianos y fúngicos no influyen en la concentración de metales antes y después del experimento.

H_1 : Los consorcios bacterianos y fúngicos influyen en la concentración de metales antes y después del experimento.

Prueba de Shapiro Wilk

Se obtiene un valor de p de 0,0001147 que es menor al nivel de significancia (0.05), por lo que se rechaza H_0 al 95% de confiabilidad, es decir que los datos no provienen de una distribución normal.

Prueba de Wilcoxon

Por cuanto no existe una hay distribución normal, aplicamos el test de Wilcoxon para muestras dependientes, obteniendo un valor de p igual a 0,003906, considerando el nivel de significancia 0,05 se acepta la H_0 al 95% de confiabilidad.

Existe una diferencia significativa entre las concentraciones registradas antes y después de la acción del inóculo bacteriano y fúngico, la cual será considerada para la evaluar la eficacia de los consorcios nativos.

4.7.2 *Influencia del tipo de metal sobre la concentración biolixiviada*

Es importante determinar si el metal incide en el factor de lixiviación, es decir, su desplazamiento a lo largo del sedimento y su influencia en la eficacia del proceso, para lo cual se aplica el test Kruskall Wallis para datos no paramétricos.

Hipótesis

H_0 : No existe una influencia del metal sobre la concentración biolixiviada

H_1 : Existe una influencia del metal sobre la concentración biolixiviada

Prueba de Shapiro Wilk

Se obtiene un valor de p igual a 0,0001147 que es menor al nivel de significancia (0.05), por lo que, rechazamos H_0 al 95% de confiabilidad, es decir no existe una distribución normal.

Prueba de Kruskall Wallis

Mediante el análisis para muestras dependientes se obtiene un p valor de 0,06081 aceptando la H_0 al 95% de confiabilidad, determinándose que el tipo de metal no influye en la concentración obtenida en el volumen biolixiviado.

4.7.3 Influencia del tratamiento sobre la concentración de metales en el lixiviado

Hipótesis

H_0 : No existe una influencia del tratamiento sobre la concentración de metales en el lixiviado

H_1 : Existe una influencia del tratamiento sobre la concentración de metales en el lixiviado.

Prueba de Shapiro Wilk

Los datos no provienen de una distribución normal por cuanto el valor de p es igual a 0,0001147 menor al nivel de significancia 0,05.

Prueba de Kruskal Wallis

Se obtiene un p valor de 0,9565 aceptando la H_0 al 95% de confiabilidad, determinándose que el tratamiento mediante consorcios bacterianos y fúngicos nativos no influye en la concentración biolixiviada del metal.

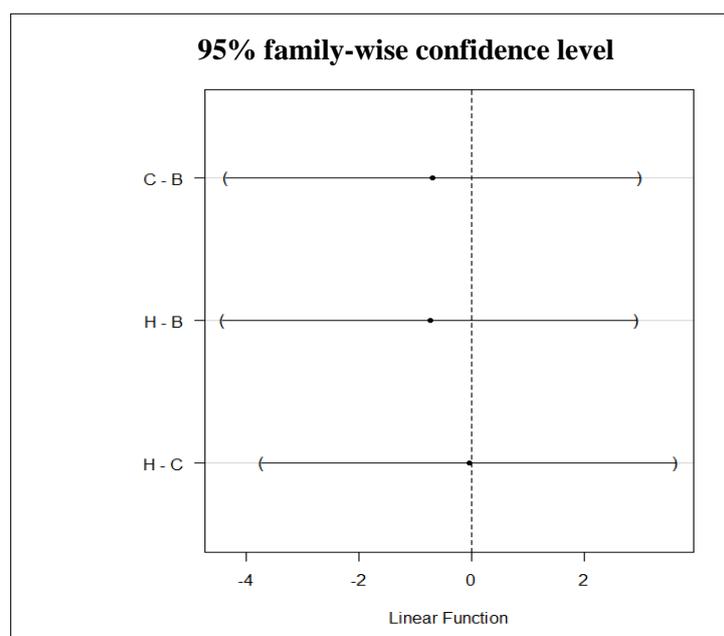


Grafico 5-4. Comparación múltiple del tratamiento.

Realizado por: FLORES, A. 2015.

En el Grafico 5-4, se corrobora que cada uno de los tratamientos si bien son similares, no demuestra ser eficaces en la biolixiviación de metales pesados mediante el uso de consorcios bacterianos y fúngicos nativos, ya que la media de los tratamientos es aproximada.

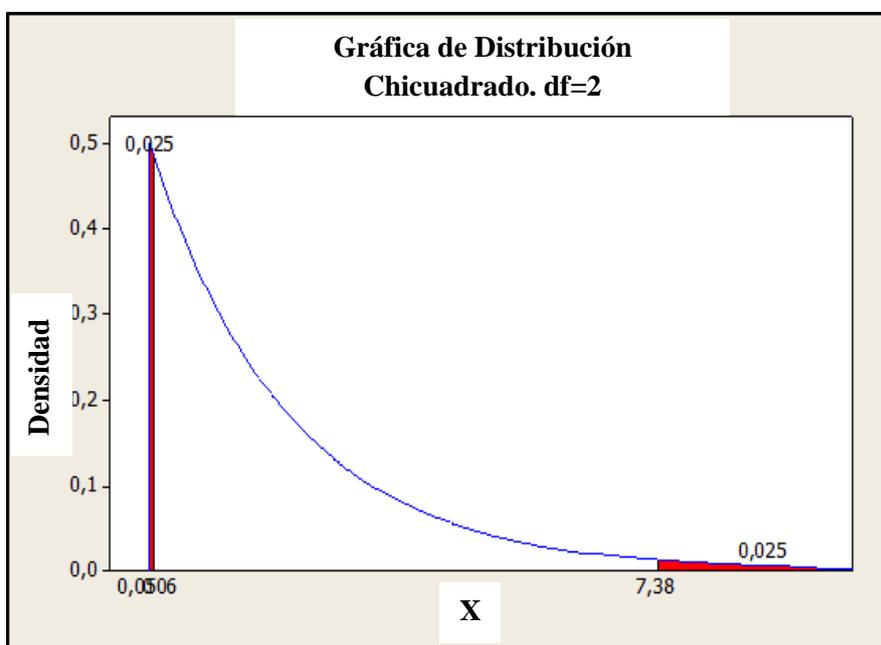


Grafico 6-4. Región de rechazo Kruskal Wallis
Realizado por: FLORES, A. 2015.

La prueba del Chi-Cuadrado con p valor de 5,79 para dos grados de libertad, se encuentra en la zona de aceptación de la H_0 al 95% como se muestra en el Grafico 6-4.

4.7.4 Relación de variables de control

Las variables de control durante la experimentación no son muy dispersas frente a las condiciones óptimas de crecimiento tanto en bacterias como en hongos, en la que cada parámetro de control se relaciona directamente en la actividad microbiana, es decir, un valor alto de temperatura puede disminuir la humedad del sedimento y por ende afectar el proceso en general.

En las siguientes graficas 7-4 y 8-4 puede observarse el comportamiento de los parámetros de control durante la biolixiviación y su influencia frente a los demás parámetros.

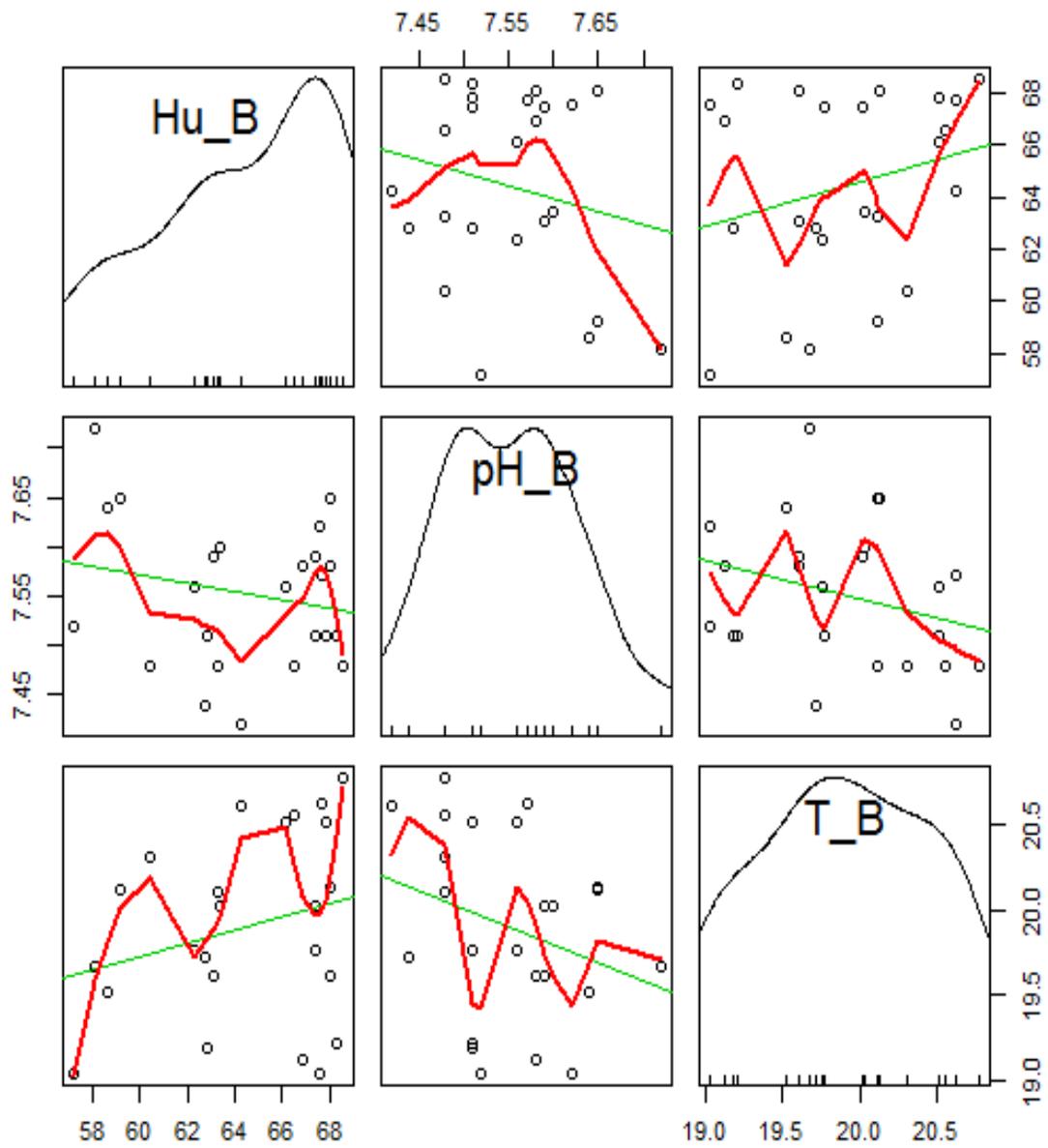


Grafico 7-4. Relación de variables de control- bacterias

Realizado por: FLORES, A.

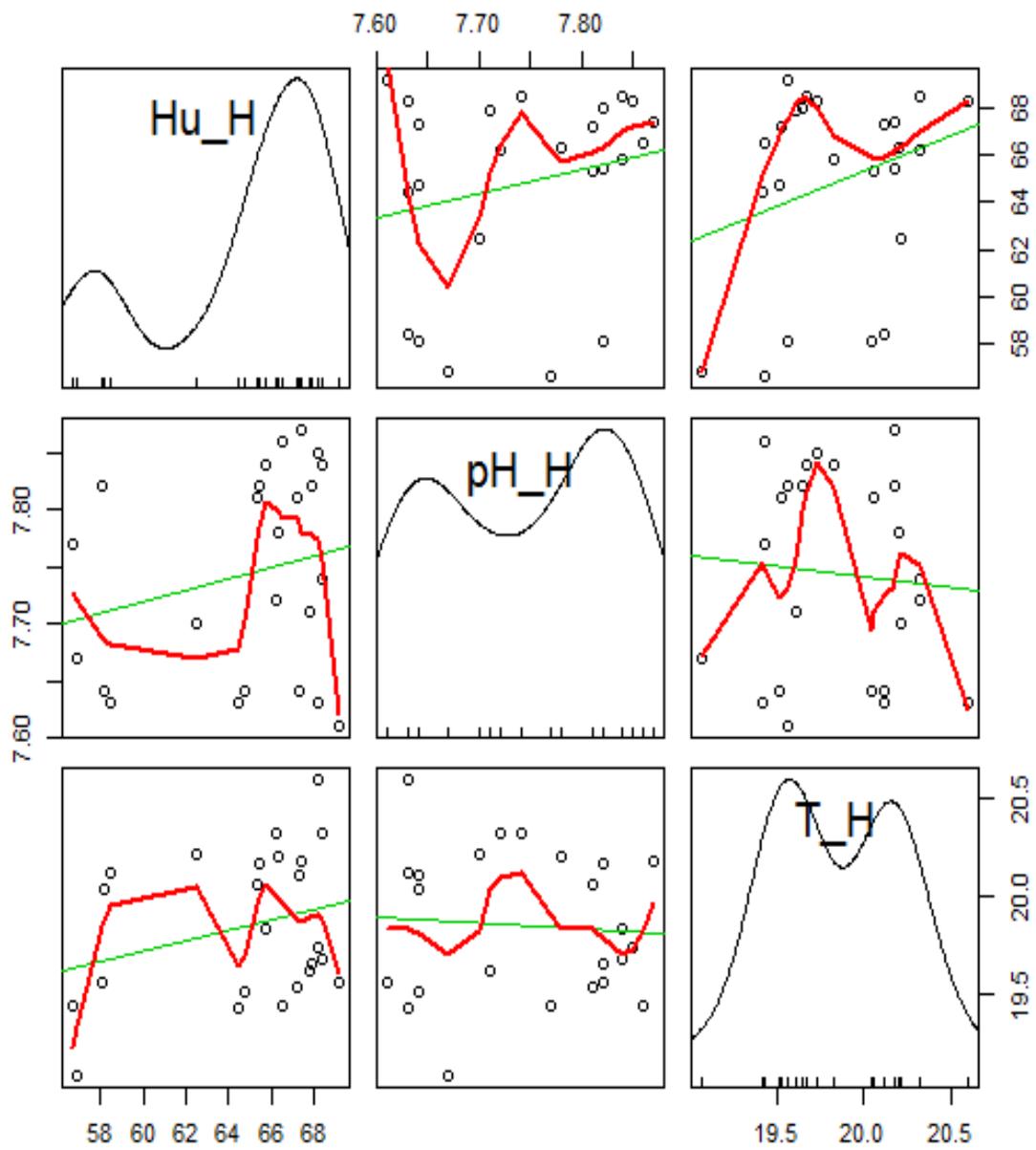


Grafico 8-4. Relación de variables de control- hongos
 Realizado por: FLORES, A.

CONCLUSIONES

- ✓ La caracterización físico química inicial del sedimento de la Laguna de San Antonio de Padua demostró la existencia de los metales de interés en las siguientes concentraciones Ba= 154,15 mg/Kg, V= 38,66 mg/Kg y Cu= 51,45 mg/Kg, siendo favorables para aplicar el proceso de biolixiviación.

- ✓ Mediante el uso de pruebas GNA y GNB se identificaron las cepas bacterianas L3, L4, L5, L7 y L10 correspondiente a la especie *Xenorhabdus nematophilys* y la cepa L12 a *E. coli* en estado inactivo. Por otro lado, se identificaron los géneros fúngicos de *Xylohypha*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillum*, *Cladosporium* y *Humicola*, hongos de tipo filamentoso.

- ✓ La biolixiviación en pilas, bajo las condiciones estudiadas, no fue efectiva en la recuperación de los metales de interés, por la baja concentración obtenida en el licor de lixiviación final, ya que el método en pilas al ser directo no es altamente selectivo en la extracción de Ba, Cu y V.

- ✓ El proceso de biolixiviación aplicando consorcios bacterianos y fúngicos nativos no resulta eficaz para desplazar Ba, Cu y V de los sedimentos de la Laguna de San Antonio, como se corrobora en el análisis estadístico, por lo que, se concluye que tanto el consorcio bacteriano y fúngico no es capaz de producir ácidos orgánicos con capacidad biolixivante en esas condiciones, a pesar de encontrarse en las condiciones óptimas de crecimiento.

RECOMENDACIONES

- ✓ Realizar profundos estudios referentes a la biolixiviación de metales pesados mediante consorcios bacteriano nativos en medios ácidos, para alcanzar liberación de contaminantes.
- ✓ Identificar las cepas bacterianas y fúngicas a nivel molecular, a fin de obtener mayores aplicaciones de la especie del microorganismo y una mayor eficiencia.
- ✓ Se recomienda hacer una caracterización de productos metabólicos de los consorcios microbianos nativos y con esto determinar la influencia de los mismos en la disolución de metales.
- ✓ Ampliar la investigación mediante estudios de la cepa *Aspergillus niger* y su aplicación en el campo de la biolixiviación ya que puede obtenerse ácido cítrico de su actividad metabólica.
- ✓ Usar el equipo de protección adecuado al manipular las cepas bacterianas y fúngicas, a fin de evitar riesgo a la salud.

BIBLIOGRAFÍA

BAHAMONDE, G. *Métodos estadísticos y principios de Diseño Experimental*. 2. ed., Quito-Ecuador: Universitaria. 1985, pp. 221-223

BARRIOS, Y. *Biorremediación: una herramienta para el saneamiento de ecosistemas marinos contaminados con petróleo*. Vol. 28. La Habana-Cuba. 2011, p. 61

CASTRO, G., y VALDÉS, J. *Concentración de metales pesados (Cu, Ni, Zn, Cd, Pb) en la biota y sedimentos de una playa artificial, en la bahía San Jorge 23°S, norte de Chile*. Vol. 40. Antofagasta-Chile. 2014, p. 268.

CAZORLA, E. *Obtención del Consorcio Bacteriano Nativo del Sedimento de la Laguna San Antonio del Cantón Riobamba*. (Tesis Ing. Biotecnología Ambiental). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Ciencias Químicas. Riobamba-Ecuador. 2012, pp. 95-101

ESCALANTE, A., et. al. *Diversidad Bacteriana del suelo: Métodos de estudio no dependientes del cultivo bacteriano e implicaciones biotecnológicas*. Vol.38. México-México: Agrociencia, 2004, pp. 583-592.

ESPINOSA, M., y LUDEÑA, K. *Lixiviación fúngica de cobre a partir de minerales del distrito minero Portovelo-Zaruma-Minas Nuevas*. (Tesis Ing. Geología). Universidad técnica Particular de Loja. Loja- Ecuador. 2007, pp.36-44

JUAREZ, A. *Biolixiviación de minerales sulfuro-ferroso en jales: aislamiento y caracterización de cultivos puros y mixtos de microorganismos involucrados*. (Tesis Dr. En Ciencias: Área Biotecnología). Universidad de Colima, Área de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, México-México 2004. pp. 9-11

JOSEPH, G.; COLWELL, L.; COLWELL, R.; *Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Department of Microbiology, Maryland-United States of America*. s.e. 1990, pp. 300-315.

MADIGAN, M., et. al. *Brock biología de los microorganismos*. 10. ed., Madrid-España: Pearson. 2004, pp. 14-20

MIDENCE, R., y GARCÍA, J. *Evaluación del potencial de bio-lixiviación fungal autóctona e inoculada de metales en suelos sedimentos contaminados en la región minera de Santo Domingo-Chontales*. Universidad Centroamericana, Facultad de ciencia, tecnología y ambiente, Departamento de desarrollo tecnológico, Managua-Nicaragua. 2013, pp. 11-12

MORENO, M. *Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos*. Aplicación de hongos en tratamientos de biorrecuperación. Dpto Microbiología Molecular, Madrid-España. s.ed. 2004, pp. 103-118

NARANJO, M. *Diseño de un Plan de Manejo Integral para la Recuperación de la Laguna San Antonio de Padua de la Ciudad de Riobamba y su Área de Influencia Directa*. (Tesis Ing. Ambiental). Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ingeniería en Geología, Minas, Petróleos y Ambiental, Escuela de Ambiente. Quito-Ecuador. 2008, pp. 27-98

PRESCOTT, L., HARLEY, J., y KLEIN, D. *Microbiología*. 5. ed., Madrid-España. McGraw-Hill Interamericana. 2004, pp. 100-103

RODRIGUEZ, E., et. al. *Bacteriología General: Principios y Prácticas de Laboratorio*. San Pedro-Costa Rica. Universidad de Costa Rica. 2005, p. 440-475

SANCHEZ, J. *Fundamentos y aspectos microbiológicos*, Oviedo-España. Universidad de Oviedo. 2010, pp. 12-15.

TORTORA, J., FUNKE, B., y CASE, C. *Introducción a la microbiología*. 9. ed., Buenos Aires-Argentina. Médica Panamericana S.A. 2007, pp. 168-185

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA. *Posgrado Recuperación de Ni y Co de Laterita Ferruginosa del Estado Cojedes a través de la Biolixiviación con Cultivos de Aspergillus Niger* [en línea]. Oviedo, fecha edición [2015-02-08]

Disponible en:

http://www.uaaan.mx/postgrado/images/files/hort/simposio5/05-aprov_residuos.pdf

VOLKE, T., et al. *Suelos contaminados por metales y metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación.* 1.ed. México-México. Illustrated. 2005, pp. 90-93

YAGNENTKOVSKY, N. *Aplicación de técnicas de biorremediación para el tratamiento de residuos industriales con alto contenido de metales pesados.* (Tesis Dr. en Ciencias). Universidad Nacional De La Plata, Facultad de Ciencias Exactas, Departamento de Química, Argentina-Buenos Aires.2012, p. 5-6

ANEXOS

Anexo A. Recuento en placa

1) Asepsia

Los materiales a utilizar en el proceso de siembra en medio sólido deben ser completamente estériles, evitando la contaminación cruzada.

2) Diluciones en serie para muestra de sedimento

La técnica de dilución en placa en relación 1/10 consiste en suspender el sedimento en agua estéril, el inóculo en observación se disuelve en una serie de tubos de 9mL.

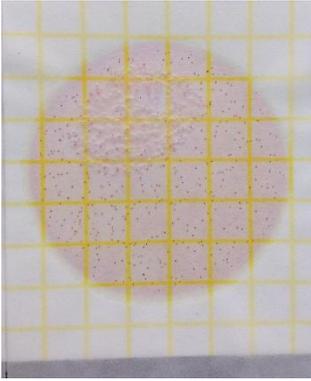
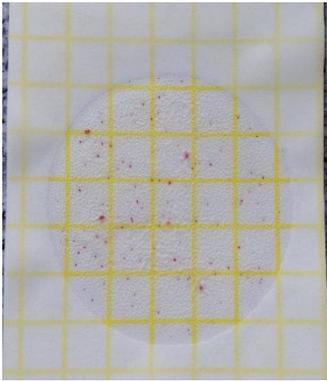
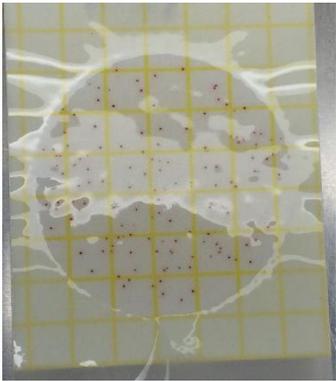
3) Diseminación en placa

Inoculación de 0,01 mL de la dilución en cada caja Petri, aplicando la técnica de estría sobre la superficie del medio enriquecido.

4) Conteo de UFC

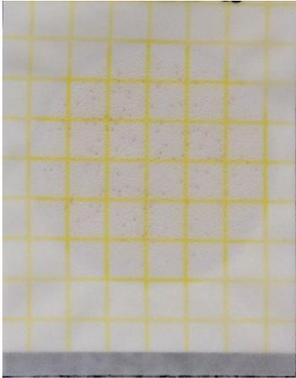
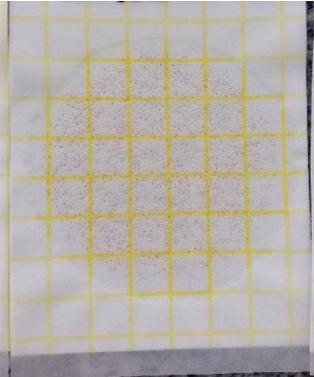
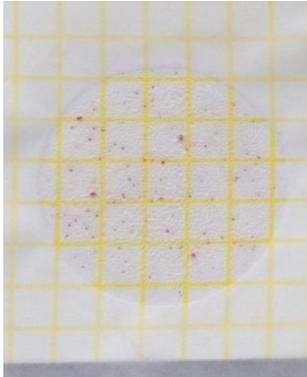
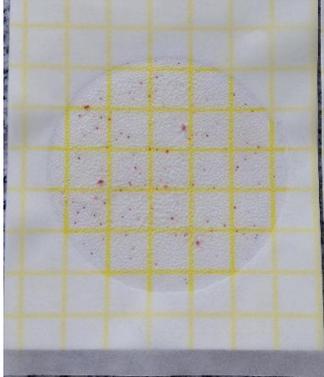
Realizar el conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) al transcurrir las horas de incubación (48h, 72h y 96h), estimar el número de bacterias presentes en cada dilución.

Anexo B. Recuento bacteriano inicial

<p>10^{-5}</p> 	<p>10^{-6}</p> 	<p>10^{-7}</p> 
<p>10^{-5}</p> 	<p>10^{-6}</p> 	<p>10^{-7}</p> 

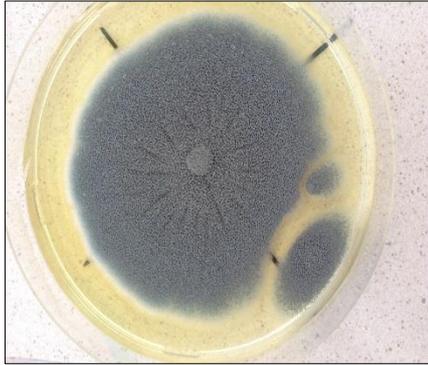
Fuente: Flores, A. 2015

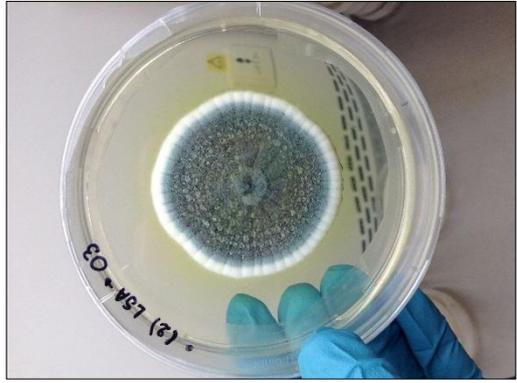
Anexo C. Conteo bacteriano posterior inoculación

<p style="text-align: center;">10^{-5}</p> 	<p style="text-align: center;">10^{-6}</p> 	<p style="text-align: center;">10^{-7}</p> 
<p style="text-align: center;">10^{-5}</p> 	<p style="text-align: center;">10^{-6}</p> 	<p style="text-align: center;">10^{-7}</p> 

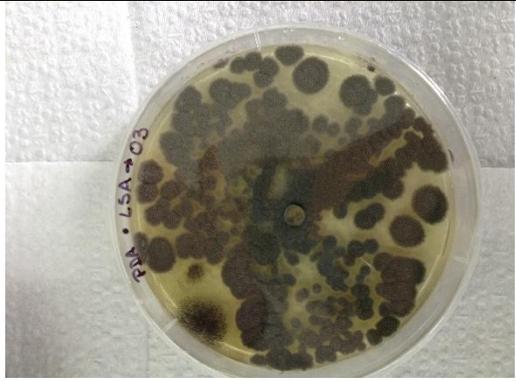
Fuente: Flores, A. 2015

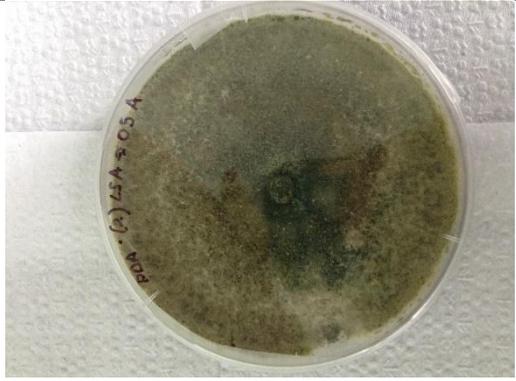
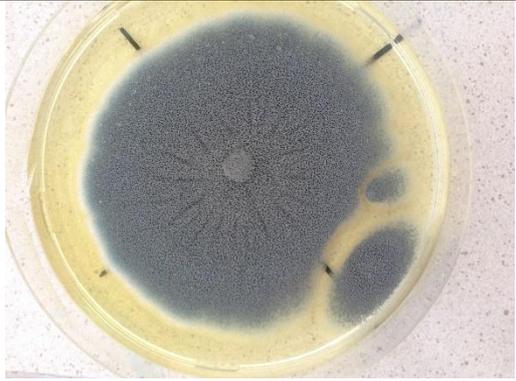
Anexo D. Aislamiento y purificación de hongos



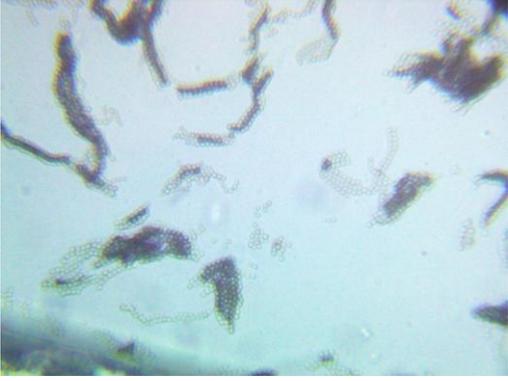
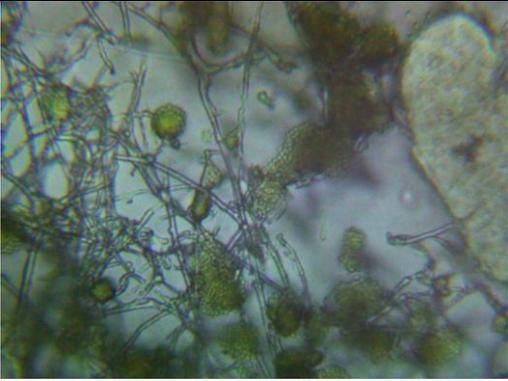


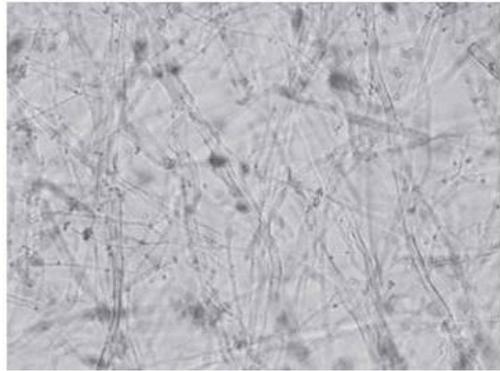
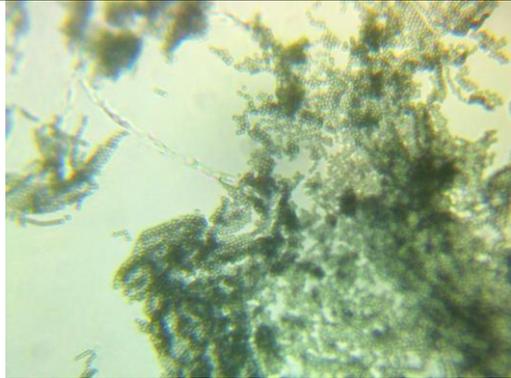
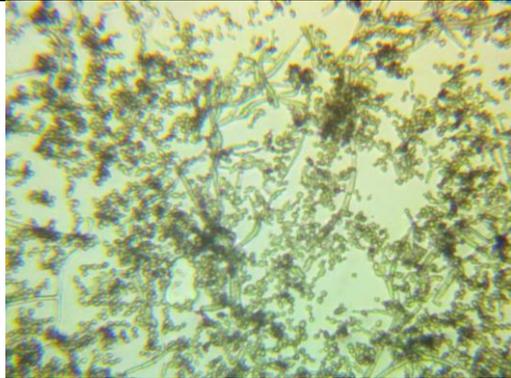
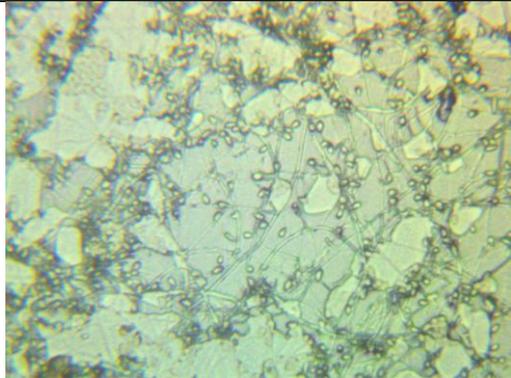
Anexo E. Especies fúngicas nativas identificadas

CÓDIGO	GÉNERO	PURIFICACIÓN
Lsa A	<i>Xylohypha</i>	
Lsa B	<i>Aspergillus</i>	
Lsa C	<i>Aspergillus</i>	
Lsa D	<i>Trichoderma</i>	

Lsa E	<i>Trichoderma</i>	 <p>A petri dish containing a greenish, fuzzy growth of <i>Trichoderma</i> on a substrate. The growth is dense and covers most of the surface. The petri dish has handwritten text on the side: "PDA - (A) LSA 205 A".</p>
Lsa F	<i>Penicillium</i>	 <p>A petri dish showing a large, circular, dark blue-green growth of <i>Penicillium</i> on a yellow substrate. The growth is dense and covers most of the surface. There are some smaller, similar growths on the right side.</p>
Lsa G	<i>Cladosporium</i>	 <p>A petri dish showing a dark, circular, fuzzy growth of <i>Cladosporium</i> on a light-colored substrate. The growth is dense and covers most of the surface.</p>
Lsa H	<i>Humicola</i>	 <p>A petri dish showing a white, fuzzy growth of <i>Humicola</i> on a light-colored substrate. The growth is dense and covers most of the surface.</p>

Anexo F. Observación microscópicas especies fúngicas

CÓDIGO	GÉNERO	OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA
Lsa A	<i>Xylohypha</i>	
Lsa B	<i>Aspergillus</i>	
Lsa C	<i>Aspergillus</i>	
Lsa D	<i>Trichoderma</i>	

Lsa E	<i>Trichoderma</i>	
Lsa F	<i>Penicillium</i>	
Lsa G	<i>Cladosporium</i>	
Lsa H	<i>Humicola</i>	

Anexo G. Registro de parámetros de control

BLANCO			BACTERIAS			HONGOS		
T(°C)	pH	Humedad %	T(°C)	pH	Humedad %	T(°C)	pH	Humedad %
18,68	7,44	56,55	19,03	7,52	57,18	19,07	7,67	56,84
18,61	7,39	53,28	19,52	7,64	58,62	19,43	7,77	56,64
18,67	7,41	55,23	19,67	7,72	58,12	19,56	7,82	58,10
19,03	7,52	54,12	20,12	7,65	59,21	20,04	7,64	58,15
19,21	7,36	53,12	20,31	7,48	60,43	20,12	7,63	58,43
19,56	7,43	55,34	20,52	7,56	66,14	20,21	7,7	62,45
19,32	7,45	55,38	20,62	7,42	64,23	19,42	7,63	64,43
19,65	7,42	54,43	19,76	7,56	62,32	19,53	7,81	67,21
19,12	7,32	53,65	19,61	7,59	63,1	19,51	7,64	64,75
19,03	7,43	54,43	20,11	7,48	63,28	20,2	7,78	66,32
19,12	7,45	54,32	19,72	7,44	62,79	20,17	7,82	65,46
19,12	7,54	53,89	19,18	7,51	62,81	19,67	7,84	68,43
19,04	7,63	55,20	20,03	7,6	63,42	19,56	7,61	69,2
19,12	7,64	53,88	20,13	7,65	68,05	19,61	7,71	67,87
19,76	7,54	54,22	20,52	7,51	67,81	20,32	7,74	68,43
19,62	7,43	53,10	20,56	7,48	66,54	20,6	7,63	68,23
19,71	7,65	53,75	20,63	7,57	67,71	19,65	7,82	67,93
19,62	7,41	54,32	20,78	7,48	68,56	19,83	7,84	65,76
19,65	7,67	55,04	19,77	7,51	67,43	20,06	7,81	65,34
19,52	7,64	54,05	19,61	7,58	68,05	20,32	7,72	66,21
19,61	7,63	53,87	19,03	7,62	67,54	19,73	7,85	68,23
20,03	7,40	55,43	19,12	7,58	66,9	19,43	7,86	66,54
20,03	7,53	55,51	19,21	7,51	68,32	20,11	7,64	67,32
19,84	7,61	55,78	20,02	7,59	67,43	20,18	7,87	67,43

REALIZADO POR: FLORES, A. 2015

Anexo H. Análisis físico- químico del sedimento

 <p>CESTTA LABCESTTA SGC</p>	<p>CENTRO DE SERVICIOS TÉCNICOS Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA AMBIENTAL</p> <p>LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL E INSPECCIÓN</p> <p>Panamericana Sur Km. 1 ½ Teléfax: (03) 3013183 ESPOCH (FACULTAD DE CIENCIAS) RIOBAMBA - ECUADOR</p>	<p>LABORATORIO DE ENSAYO ACREDITADO POR EL OAE</p> <p>ACREDITACIÓN Nº OAE LE 2C 06-008</p>
--	--	--

INFORME DE ENSAYO No:	1762
ST:	14- 112 ANÁLISIS DE SUELOS
Nombre Peticionario:	NA
Atm:	Dr. Roberto Erazo
Dirección:	Panamericana Sur km 1 ½
FECHA:	18 de Septiembre del 2014
NUMERO DE MUESTRAS:	1
FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB:	2014/09/10 16:00
FECHA DE MUESTREO:	2014/09/10 12:00
FECHA DE ANALISIS:	2014/09/10 - 2014/09/18
TIPO DE MUESTRA:	Suelo
CÓDIGO LABCESTTA:	LAB-S 340-14
CÓDIGO DE LA EMPRESA:	LSA-01
PUNTO DE MUESTREO:	Laguna San Antonio
ANÁLISIS SOLICITADO:	Físico- Químico
PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA:	Alejandro Flores
CONDICIONES AMBIENTALES:	T máx.: 25.0 °C. T mín.: 15.0 °C

RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETROS	MÉTODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	INCERTIDUMBRE (k=2)	VALOR LÍMITE PERMISIBLE (M)
Hidrocarburos Totales	PEE/LABCESTTA/26 TNRCC 1005	mg/Kg	84,83	±26%	-
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos	PEE/LABCESTTA/23 EPA SW-846 Method 8310	mg/Kg	< 0,3	±30%	-
*Bario	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3050B-3051/6010B	mg/Kg	154,15	-	-
*Vanadio	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3050B-3051/6010B	mg/Kg	38,66	-	-
*Cobre	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3050B-3051/6010B	mg/Kg	51,45	-	-
*Nitrógeno Total	PEE/LABCESTTA/88 Kjeldhal	%	0,14	-	-
*Fósforo Total	PEE/LABCESTTA/197 EPA3051a / Espectrofotometría	mg/Kg	195,43	-	-
*Potasio	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	1551,50	-	-
Potencial de Hidrógeno	PEE/LABCESTTA/24 EPA 9045 D	Unidades de pH	7,44	±0,15	-
*Humedad	PEE/LABCESTTA/80 ASTM D4959	%	39	-	-

Este documento no puede ser reproducido ni total ni parcialmente sin la aprobación escrita del laboratorio.
Los resultados arriba indicados solo están relacionados con los objetos ensayados
MC01-14

Página 1 de 2
Edición 3

FUENTE: LAB-CESTTA

Anexo I. Análisis físico- químico del lixiviado

 <p>CESTTA SGC</p>	<p>CENTRO DE SERVICIOS TÉCNICOS Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA AMBIENTAL</p> <p>DEPARTAMENTO : LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL E INSPECCIÓN (LABCESTTA)</p> <p>Panamericana Sur Km. 1 ½, ESPOCH (Facultad de Ciencias) RIOBAMBA - ECUADOR Telefax: (03) 3013183</p>
--	---

INFORME DE ENSAYO No. ST:	747 15 - 008 ANÁLISIS DE LIXIVIADOS
Nombre Peticionario:	NA
Atm. Dirección:	Dr. Roberto Erazo Panamericana Sur km 1 ½ Riobamba - Chimborazo 07 de Mayo del 2015
FECHA:	1
NUMERO DE MUESTRAS:	2015/04/28 - 08:34
FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB:	2015/04/15 - 08:00
FECHA DE MUESTREO:	2015/04/28 - 2015/05/07
FECHA DE ANALISIS:	Lixiviado
TIPO DE MUESTRA:	LAB-L.011-15
CÓDIGO LABCESTTA:	LSA-H
CÓDIGO DE LA EMPRESA:	Laboratorio de Biotecnología de facultad de Ciencias
PUNTO DE MUESTREO:	Físico - Químico
ANÁLISIS SOLICITADO:	Alejandro Flores
PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA:	T máx.:25.0 °C. T mín.: 15.0°C
CONDICIONES AMBIENTALES:	

RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETROS	MÉTODO/NORMA	UNIDAD	RESULTADO	VALOR LÍMITE PERMISIBLE (■)
Vanadio	PEE/LABCESTTA/174 EPA245.7/EPA 3015*	µg/l	11,19	-
Bario	PEE/LABCESTTA/174 EPA245.7/EPA 3015*	µg/l	168,30	-
Cobre	EPA 1311 / 200.7 ICP	µg/l	5,76	-

OBSERVACIONES:

- Muestra receptada en el laboratorio.

RESPONSABLE DEL INFORME:

Dr. Mauricio Álvarez
RESPONSABLE TÉCNICO



**CENTRO DE SERVICIOS TÉCNICOS Y
TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA AMBIENTAL**
DEPARTAMENTO :
**LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL E INSPECCIÓN
(LABCESTTA)**
Panamericana Sur Km. 1 ½, ESPOCH (Facultad de Ciencias)
RIOBAMBA - ECUADOR
Teléfono: (03) 3013183

INFORME DE ENSAYO No.
ST:

747
15 - 008 ANÁLISIS DE LIXIVIADOS

Nombre Peticionario:
Atn.
Dirección:

NA
Dr. Roberto Erazo
Panamericana Sur km 1 ½
Riobamba - Chimborazo
07 de Mayo del 2015

FECHA:
NUMERO DE MUESTRAS:
FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB:
FECHA DE MUESTREO:
FECHA DE ANALISIS:
TIPO DE MUESTRA:
CODIGO LABCESTTA:
CODIGO DE LA EMPRESA:
PUNTO DE MUESTREO:
ANALISIS SOLICITADO:
PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA:
CONDICIONES AMBIENTALES:

1
2015/04/28 - 08:34
2015/04/15 - 08:00
2015/04/28 - 2015/05/07
Lixiviado
LAB-L 012-15
ISA-B
Laboratorio de Biotecnología de facultad de Ciencias
Físico - Químico
Alejandro Flores
T máx.: 25.0 °C. T mín.: 15.0 °C

RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETROS	MÉTODO/NORMA	UNIDAD	RESULTADO	VALOR LÍMITE PERMISIBLE (■)
Vanadio	PEE/LABCESTTA/174 EPA245.7/EPA 3015*	µg/l	53,55	-
Bario	PEE/LABCESTTA/174 EPA245.7/EPA 3015*	µg/l	142,00	-
Cobre	EPA 1311 / 200.7 ICP	µg/l	4,85	-

OBSERVACIONES:

- Muestra receptada en el laboratorio.

RESPONSABLE DEL INFORME:

Dr. Mauricio Álvarez
RESPONSABLE TÉCNICO



**CENTRO DE SERVICIOS TÉCNICOS Y
TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA AMBIENTAL**
DEPARTAMENTO :
**LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL E INSPECCIÓN
(LABCESTTA)**
**Panamericana Sur Km. 1 ½, ESPOCH (Facultad de Ciencias)
RIOBAMBA - ECUADOR
Teléfono: (03) 3013183**

INFORME DE ENSAYO No. 747
ST: 15 - 008 ANÁLISIS DE LIXIVIADOS

Nombre Peticionario: NA
Atn. Dr. Roberto Erazo
Dirección: Panamericana Sur km 1 ½
Riobamba - Chimborazo

FECHA: 07 de Mayo del 2015
NUMERO DE MUESTRAS: 1
FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN EN LAB: 2015/04/28 - 08:34
FECHA DE MUESTREO: 2015/04/15 - 08:00
FECHA DE ANALISIS: 2015/04/28 - 2015/05/07
TIPO DE MUESTRA: Lixiviado
CÓDIGO LABCESTTA: LAB-L 013-15
CÓDIGO DE LA EMPRESA: LSA-BA
PUNTO DE MUESTREO: Laboratorio de Biotecnología de facultad de Ciencias
ANÁLISIS SOLICITADO: Físico - Químico
PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA: Alejandro Flores
CONDICIONES AMBIENTALES: T máx.:25.0 °C. T mín.: 15.0°C

RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETROS	MÉTODO/NORMA	UNIDAD	RESULTADO	VALOR LÍMITE PERMISIBLE (■)
Vanadio	PEE/LABCESTTA/174 EPA245.7/EPA 3015*	µg/l	4,48	-
Bario	PEE/LABCESTTA/174 EPA245.7/EPA 3015*	µg/l	396,00	-
Cobre	EPA 1311 / 200.7 ICP	µg/l	5,85	-

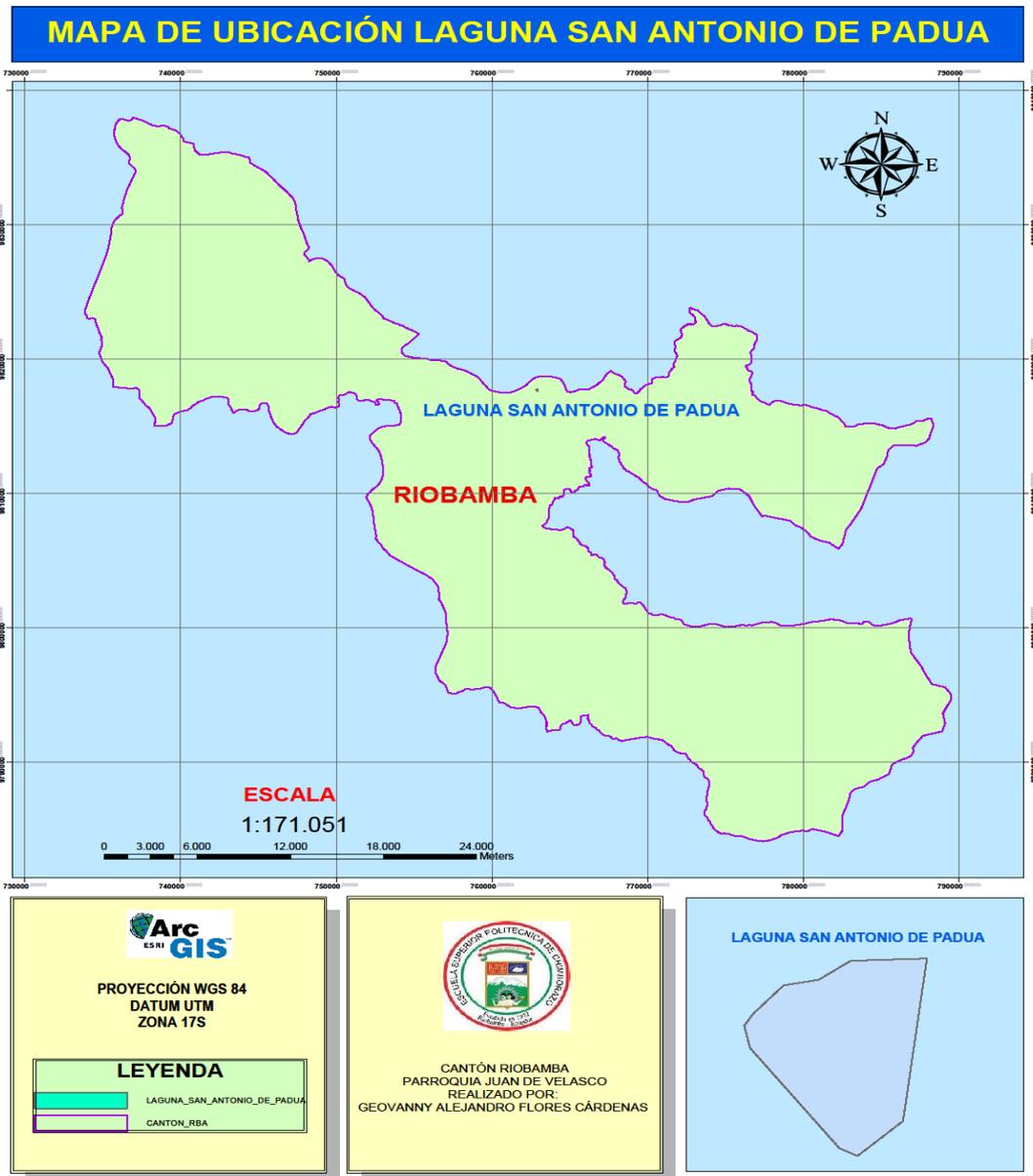
OBSERVACIONES:

- Muestra receptada en el laboratorio.

RESPONSABLE DEL INFORME:

Dr. Mauricio Álvarez
RESPONSABLE TÉCNICO

Anexo J. Mapa de ubicación Laguna de San Antonio



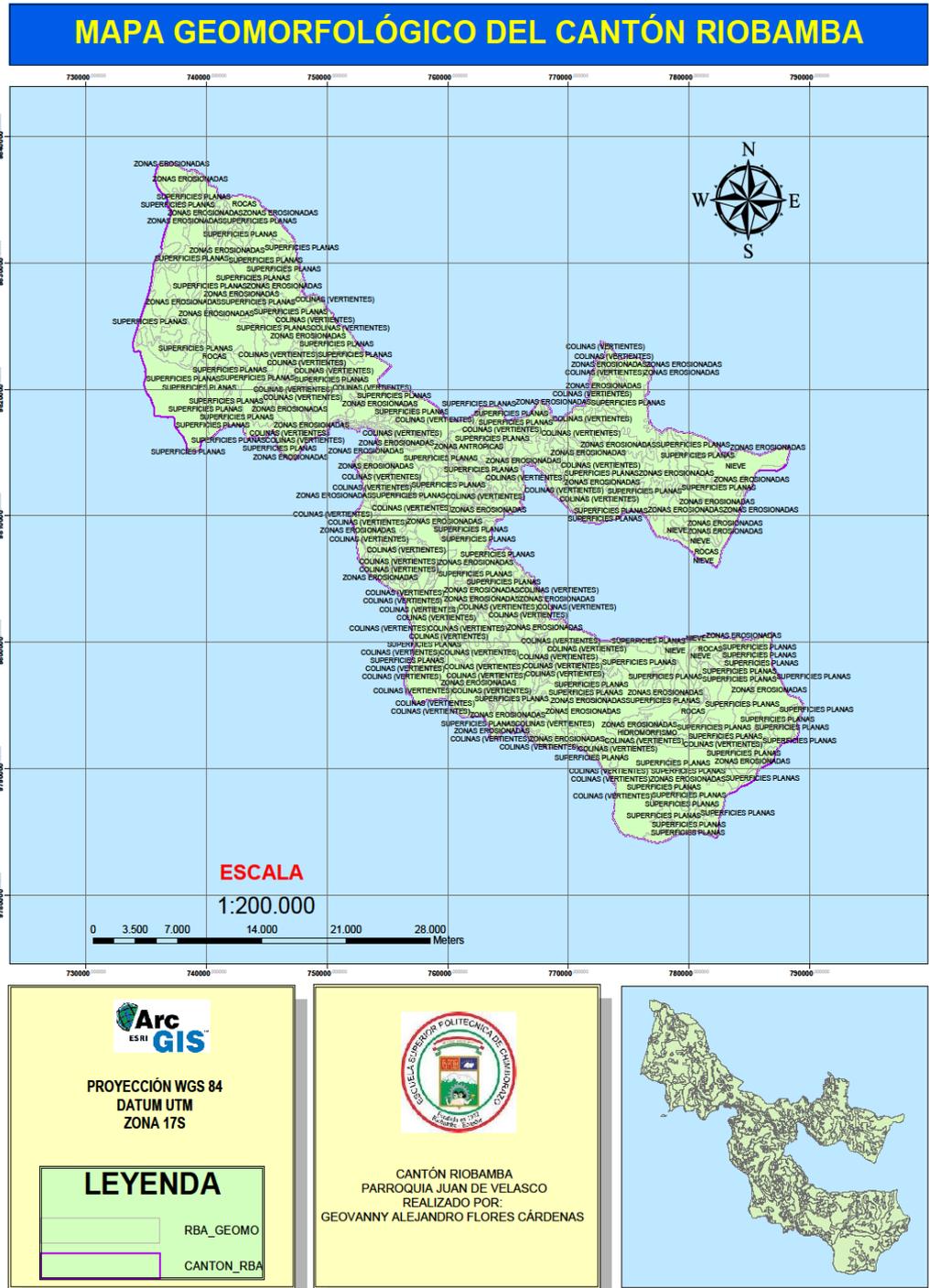
Realizado por: FLORES, A.2015

Anexo K. Mapa geológico del cantón Riobamba



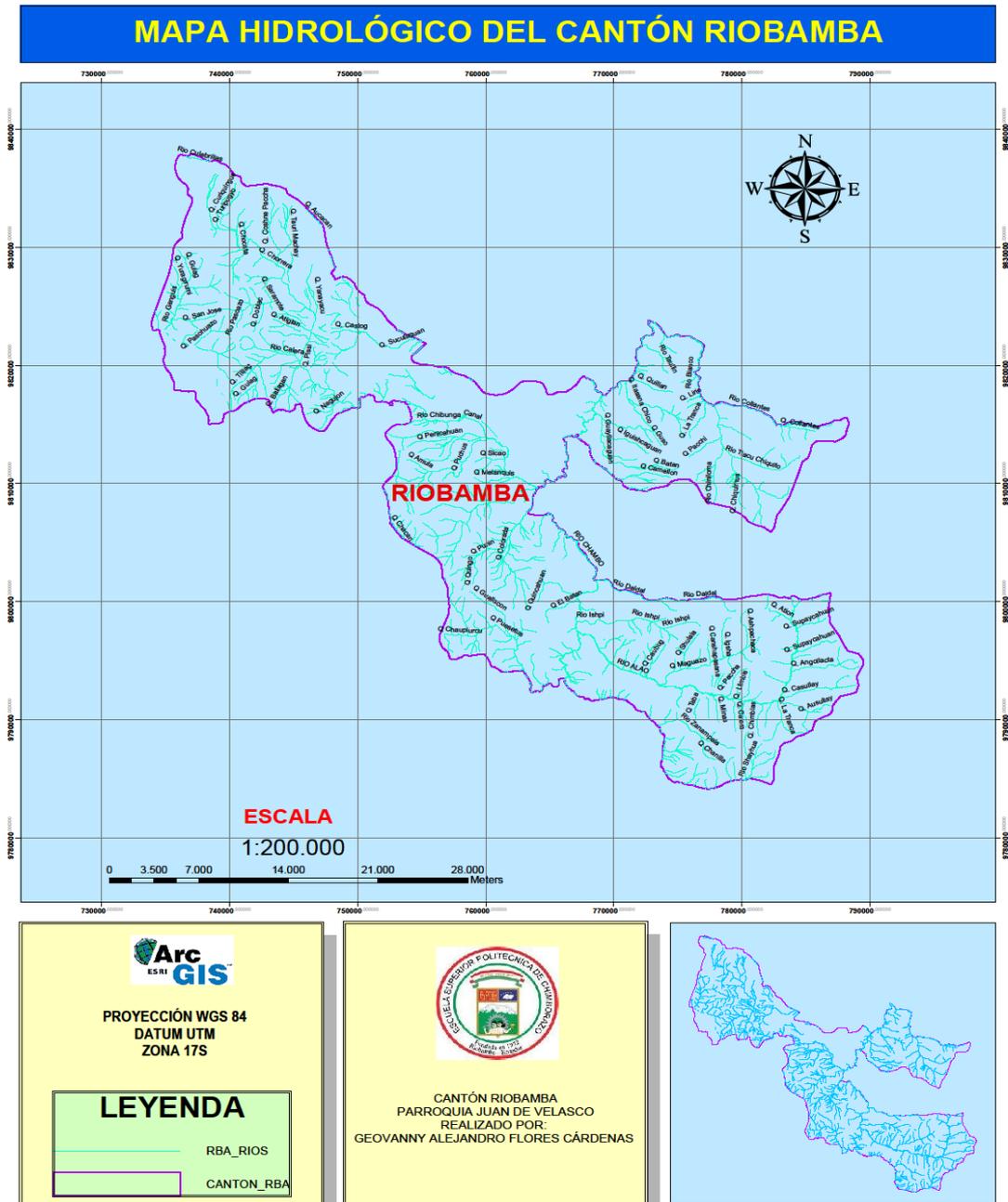
Realizado por: FLORES, A.2015

Anexo L. Mapa geomorfológico del cantón Riobamba



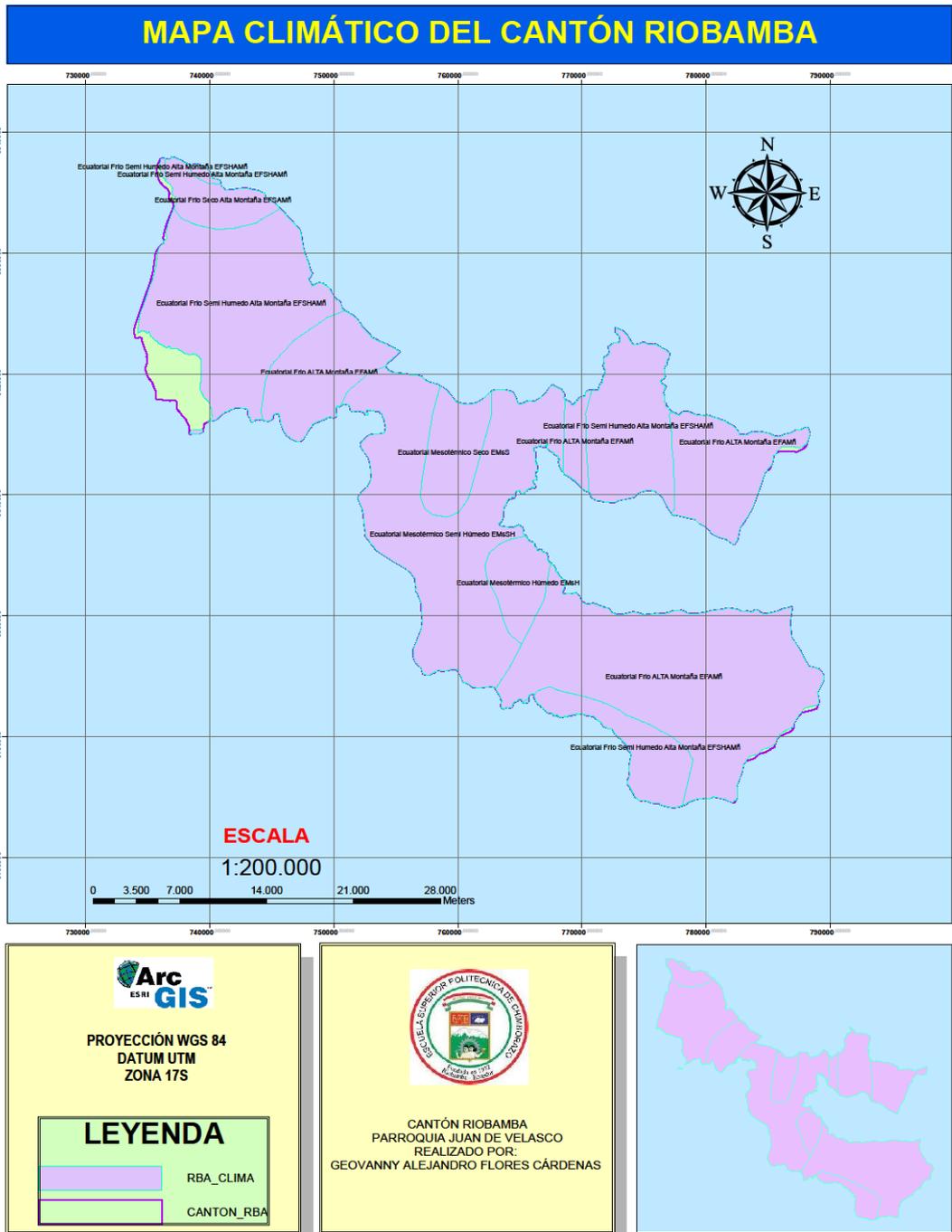
Realizado por: FLORES, A.2015

Anexo M. Mapa hidrológico del cantón Riobamba



Realizado por: FLORES, A.2015

Anexo N. Mapa climático del cantón Riobamba



Realizado por: FLORES, A.2015

Anexo Ñ. Toma de muestra de sedimentos



Realizado por: FLORES, A. 2015



Realizado por: FLORES, A. 2015

Anexo O. Siembra de hongos

