



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
COLTA DEL CANTÓN COLTA.”**

TRABAJO DE TITULACIÓN

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

PRESENTADO POR
ANABEL CRISTINA CÁCERES DEL SALTO

TUTOR
DRA. NANCY VELOZ

Riobamba – Ecuador

2015

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

El Tribunal de Trabajo de Titulación 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 COLTA DEL CANTÓN COLTA.”**, de responsabilidad de la señorita egresada Anabel Cristina Cáceres del Salto ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

NOMBRE	FIRMA	FECHA
Dra. Nancy Veloz DIRECTORA DE TRABAJO DE TITULACIÓN	_____	_____
Dr. Roberto Erazo MIEMBRO DEL TRIBUNAL	_____	_____

“Yo Anabel Cristina Cáceres del Salto soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis, y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado pertenecen a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo”.

Anabel Cristina Cáceres del Salto

AGRADECIMIENTO

A Dios Todopoderoso por guiarme día a día en mi camino y darme salud y vida para emprender este proyecto.

A mis padres Germán Cáceres y Anabel del Salto, por estar a junto a mí en cada proyecto y enseñarme a afrontar las dificultades con valor.

A mis hermanas y hermano por creer en mí, en todo momento.

A mis amigos, que son como mis hermanos, por sus ánimos y apoyo incondicional.

A la Dra. Nancy Veloz y al Dr. Roberto Erazo, por la confianza depositada, sus conocimiento y orientación para la realización de esta investigación.

Al personal del LAB-CESTTA, Ing. Verónica Bravo, Ing. Marcela Erazo, Ing. Cristian Chuquín, Ing. Jorge Miranda, por los consejos, conocimiento y apoyo brindados a lo largo del desarrollo de la investigación.

A la Ing. Paola Chiliza por su motivación y a la Dra. Norma Erazo, por su asesoramiento y colaboración.

Anabel Cáceres

DEDICATORIA

Para mis padres que me enseñaron a ser quién soy, y me dieron su amor y cariño incondicional este logro es para ustedes, gracias por darme la fuerza para alcanzar mis metas.

A mis hermanas Paulina, Carina y mi hermano Germán, por ser mi ejemplo, mi apoyo y mis mejores amigos.

A la memoria de mi abuelito Tobolo, que desde el cielo me sigue cuidando, guiando y brindándome su amor.

A toda mi familia, por la confianza depositada.

Anabel Cáceres

TABLA DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	i
ÍNDICE DE TABLAS	iii
ÍNDICE DE GRÁFICOS	v
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES	vi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	vii
RESUMEN	ix
SUMMARY.....	x
INTRODUCCIÓN	- 1 -
JUSTIFICACIÓN	- 2 -
OBJETIVOS	- 3 -
GENERAL.....	- 3 -
ESPECÍFICOS.....	- 3 -
CAPÍTULO I	- 4 -
1. MARCO TEÓRICO	- 4 -
1.1. Biorremediación	- 4 -
1.1.1. Mecanismos biológicos aplicables a la biorremediación de sedimentos	- 4 -
1.2. Biolixiviación	- 5 -
1.2.1. Mecanismo de Biolixiviación microbiana	- 6 -
1.2.2. Diversidad de microorganismos en un sistema de biolixiviación.....	- 7 -
1.2.3. Factores que influyen en la biolixiviación	- 7 -
1.3. Microorganismos de lixiviación	- 7 -
1.3.1. Bacterias	- 7 -
1.3.2. Hongos	- 8 -
1.4. Crecimiento microbiano	- 9 -
1.4.1. Requerimiento para el crecimiento microbiano	- 10 -
1.4.2. Ciclo de crecimiento microbiano.	- 13 -
1.5. Sedimentos	- 14 -
1.5.1. Origen y composición de los sedimentos lacustres	- 14 -
1.6. Metales pesados.....	- 15 -
1.6.1. Interacciones microorganismos- metales	- 15 -
1.6.2. Transformaciones para tratamiento de metales	- 16 -
CAPÍTULO II	- 18 -

2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	- 18 -
2.1.	Descripción del área de estudio	- 18 -
2.1.2.	Delimitación del área de estudio.....	- 19 -
2.1.2.1.	Área de influencia directa	- 19 -
2.1.2.2.	Área de influencia indirecta	- 19 -
2.1.2.3.	Objeto de estudio.....	- 19 -
2.2.	Descripción de área de investigación.....	- 19 -
2.2.1.	Geología	- 19 -
2.2.2.	Geomorfología.....	- 20 -
2.2.3.	Clima y meteorología	- 20 -
2.2.4.	Hidrogeología.....	- 21 -
2.2.5.	Flora y fauna.....	- 21 -
2.2.6.	Población.....	- 25 -
2.3.	Diseño experimental.....	- 26 -
2.3.1.	Tipo de diseño	- 26 -
2.3.2.	Tratamientos.....	- 26 -
2.3.3.	Variables de control.....	- 27 -
	CAPÍTULO III.....	- 28 -
3.1.	Procesamiento de muestras biológicas.....	- 28 -
3.2.	Aislamiento y purificación de las cepas fúngicas	- 29 -
3.3.	Identificación y caracterización de las cepas fúngicas.....	- 30 -
3.4.	Conservación de cepas fúngicas	- 31 -
3.5.	Preparación del inóculo líquido fúngico	- 33 -
3.6.	Reactivación de cepas bacterianas.....	- 34 -
3.7.	Preparación del inóculo líquido bacteriano.....	- 35 -
3.8.	Métodos analíticos.....	- 36 -
3.8.1.	Determinación de metales (V,Ba,Cu) por ICP	- 36 -
3.8.2.	Determinación de pH.....	- 37 -
3.8.3.	Determinación de la humedad	- 37 -
3.8.4.	Determinación de temperatura.....	- 38 -
3.9.	Métodos microbiológicos	- 38 -
3.9.1.	Determinación de concentración bacteriana	- 38 -
	CAPITULO IV.....	- 39 -
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	- 39 -
4.1.	Análisis físico químico del sedimento	- 39 -
4.2.	Identificación de cepas bacterianas.....	- 40 -

4.3.	Identificación de cepas fúngicas	- 41 -
4.4.	Prueba de biolixiviación de metales en cada uno de los inóculos conformados.....	- 43 -
4.4.1.	Inóculo bacteriano y fúngico	- 43 -
4.4.2.	Biolixiviación en pilas	- 44 -
4.5.	Análisis de datos del diseño experimental	- 44 -
4.5.1.	Obtención del sedimento para pruebas de biolixiviación	- 44 -
4.5.2.	Caracterización y parámetros de análisis del sedimento	- 45 -
4.5.3.	Análisis de las unidades de control	- 45 -
4.6.	Seguimiento de variables de control	- 47 -
4.6.1.	Temperatura y humedad en el proceso de biolixiviación	- 47 -
4.6.2.	pH durante el proceso de biolixiviación.....	- 48 -
4.6.3.	Carga bacteriana	- 49 -
4.6.4.	Carga fúngica	- 49 -
4.7.	Eficacia del proceso de biolixiviación	- 50 -
4.7.1.	Influencia de los consorcios bacteriano y fungico	- 50 -
4.7.2.	Influencia del tipo de metal sobre la concentración del biolixiviado	- 51 -
4.7.3.	Influencia del tratamiento sobre la concentración de metales en el lixiviado. -	52 -
4.7.4.	Relación de variables de control	- 53 -
	CONCLUSIONES	- 56 -
	RECOMENDACIONES	- 57 -
	BIBLIOGRAFÍA	- 58 -
	ANEXOS	- 60 -

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

%	Porcentaje
°C	Grados celsius
°K	Grados kelvin
µm	Micras
As	Arsénico
Ba	Bario
Ca	Cadmio
CESTTA	Centro de Servicios Técnicos y Transferencia Tecnológica Ambiental
CH₄	Metano
Co	Cobalto
CO₂	Dióxido de carbono
Cr	Cromo
Cu	Cobre
Cu₂S	Sulfuro de cobre o calcocita
CuSO₄	Sulfato de cobre
et al	entre otros
Fe	Hierro
FeO	Oxido de hierro
H₂O	Agua
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
Ha	Hectáreas
ICP	Plasma de acoplamiento inductivo
kg	Kilogramo
KH₂PO₄	Fosfato diácido de potasio
Km	Kilómetro

m	metros
Mg	Magnesio
MgSO₄	Sulfato de Magnesio
MHz	Megahercio
ml	Militros
mm	Milímetros
Mn	Manganeso
Mo	Molibdeno
NaCl	Cloruro de Sodio
NH₄Cl	Cloruro de Amonio
Ni	Niquel
p.a	Para análisis
PDA	Patata dextrosa agar
pH	Potencial hidrógeno
S	Azufre
Se	Selenio
Tc	Tecnecio
U	Uranio
USDA	United States Department of Agriculture
UTM	Universal Transverse Mercator
V	Vanadio
Zn	Cinc

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	EFFECTOS DEL OXÍGENO SOBRE EL CRECIMIENTO DE DIVERSOS TIPOS DE BACTERIAS.....	-12-
Tabla 2-2:	MÉTODOS DE ANÁLISIS SEDIMENTOS.....	-14-
Tabla 1-2:	DATOS METEOROLÓGICOS DEL CANTÓN COLTA.....	-20-
Tabla 2-2:	FLORA DE LA LAGUNA DE COLTA.....	-21-
Tabla 3-2:	FAUNA DE LA LAGUNA DE COLTA.....	-24-
Tabla 1-4:	CARACTERIZACIÓN FISICO QUIMICA DE SEDIMENTO.....	-39-
Tabla 2-4:	CEPAS BACTERIANAS DE LA LAGUNA DE COLTA.....	-40-
Tabla 3-4:	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS DE LAS CEPAS FÚNGICAS.....	-42-
Tabla 4-4:	CONCENTRACIÓN DE METALES PESADOS EN EL SEDIMENTO.....	-45-
Tabla 5-4:	VOLUMEN DE LIXIVIADO RECOLECTADO SEMANALMENTE.....	-46-
Tabla 6-4:	CONCENTRACIÓN DE METALES EN LOS LIXIVIADOS.....	-46-
Tabla 7-4:	REGISTRO INICIAL DE UFC EN EL SEDIMENTO.....	-49-
Tabla 8-4:	REGISTRO DE UFC POSTERIOR A LA COLOCACIÓN DEL INÓCULO EN EL SEDIMENTO.....	-49-
Tabla 9-4:	REGISTRO DE CARGA FÚNGICA INICIAL DE SEDIMENTO.....	-50-

Tabla 10-4:	REGISTRO DE CARGA FÚNGICA POSTERIOR A LA COLOCACIÓN DEL INÓCULO EN ELSEDIMENTO.....	-50-
Tabla 14-4:	DATOS INGRESADOS A R-COMMANDER.....	-50-

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-4:	VOLUMEN DE LIXIVIADO OBTENIDO DEL SEDIMENTO.....	-46-
Gráfico 2-4:	CONTROL DE TEMPERATURA.....	-47-
Gráfico 3-4:	CONTROL DE HUMEDAD.....	-48-
Gráfico 4-4:	CONTROL DE PH.....	-48-
Gráfico 5-4:	GRAFICA DE DISTRIBUCIÓN CHICUADRADO.....	-52-
Gráfico 6-4:	COMPARACIÓN MÚLTIPLE DEL TRATAMIENTO.....	-53-
Gráfico 7-4:	RELACIÓN DE LAS VARIABLES DE CONTROL EN BACTERIAS.....	-54-
Gráfico 8-4:	RELACIÓN DE LAS VARIABLES DE CONTROL EN HONGOS.....	-55-

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1-1:	INTERACCIONES ENTRE METALES Y MICROORGANISMOS.....	-5-
Ilustración 2-1:	TIPOS DE MICROORGANISMOS SEGÚN SU TEMPERATURA.....	-10-
Ilustración 3-1:	FASES DE CRECIMIENTO MICROBIANO.....	-14-
Ilustración 1-2:	MAPA UBICACIÓN LAGUNA DE COLTA.....	-18-
Ilustración 1-3:	PREPARACIÓN DE CAJAS PETRI CON AGAR.....	-29-
Ilustración 2-3:	AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE CEPAS FÚNGICAS.....	-30-
Ilustración 3-3:	OBSERVACIÓN DE PLACAS AL MICROSCOPIO.....	-31-
Ilustración 4-3:	CONSERVACIÓN DE CEPAS FÚNGICAS.....	-32-
Ilustración 5-3:	INÓCULO FÚNGICO.....	-33-
Ilustración 6-3:	REACTIVACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS.....	-34-
Ilustración 7-3:	PREPARACIÓN DEL INÓCULO BACTERIANO.....	-35-
Ilustración 8-3:	INÓCULO BACTERIANO.....	-36-
Ilustración 1-4:	PRUEBAS DE ANTAGONISMO EN BACTERIAS.....	-40-
Ilustración 2-4:	BIOPILAS DE LIXIVIACIÓN.....	-44-

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A:	TOMA DE MUESTRAS DE SEDIMENTOS EN LA LAGUNA DE COLTA.....	-60-
Anexo B:	MUESTRAS DE SEDIMENTOS DE LA LAGUNA DECOLTA.....	-60-
	-60-
Anexo C:	ESTERILIZACIÓN DE MEDIOS MÍNIMOS NUTRITIVOS.....	-61-
Anexo D:	INCUBACIÓN DE MEDIOS CON CEPAS.....	-61-
Anexo E:	SIEMBRA DE MUESTRAS SE SEDIMENTOS PARA OBTENCIÓN DE CEPAS FÚNGICAS.....	-62-
Anexo F:	PURIFICACIÓN DE CEPAS FUNGICAS.....	-62-
Anexo G:	CONTEO BACTERIANO EN PLACAS PETRIFILM.....	-63-
Anexo H:	CONSERVACIÓN DE CEPAS EN SOLUCIÓN DE GLICEROL.....	-63-
Anexo I:	MUESTRAS DE LIXIVIADOS PARA ANÁLISIS.....	-64-
Anexo J:	LECTURA DE METALES EN EQUIPO ICP.....	-64-
Anexo K:	REGISTRO DE TEMPERATURA, PH Y HUMEDAD DURANTE EL PROCESO DE BIOLIXIVIACIÓN.....	-65-
Anexo L:	TÉCNICA DE CONTEO EN PLACA.....	-66-
Anexo M:	RESULTADOS DE CEPAS FÚNGICA ENCONTRADAS.....	-67-

Anexo N:	INFORMES DE RESULTADOS DE LOS SEDIMENTOS.....	-71-
Anexo Ñ:	INFORMES DE RESULTADOS DE LOS LIXIVIADOS.....	-73-

RESUMEN

La investigación tiene como objetivo evaluar la eficacia de consorcios bacterianos y fúngicos nativos para biolixiviar los metales pesados específicamente el Bario, Vanadio y el Cobre presentes en la muestras de sedimentos de la Laguna de Colta del Cantón Colta.

Se realizó la caracterización físico-química y microbiológica del sedimento, aislamiento y purificación de las cepas bacterianas y fúngicas mediante técnicas de siembras sucesivas.

Se efectuó la caracterización macroscópica y microscópica de las cepas, se procedió a realizar diferentes pruebas de selección: antagonismo e identificación en bacterias y hongos, para su posterior masificación e inoculación en el sedimento, el proceso se ejecutó para la obtención de los consorcios fúngicos nativos de los sedimentos provenientes de la Laguna de Colta. Utilizando equipos como: Cámara de flujo laminar horizontal, autoclave, incubadora, plasma acoplado inductivamente (ICP), estufa, entre los principales.

Al finalizar las pruebas de selección se obtuvo 10 cepas de hongos formando el consorcio fúngico, pertenecientes a los siguientes géneros: *Aspergillus*, *Aphanoascus*, *Penicillium*, *Asteromyces*, *Gliocladium* y *Lacellinopsis*, y un consorcio bacteriano conformado por 9 cepas de los siguientes géneros *Escherichia coli-inactive*, *Xenorhabdus nematophilys*, *Providencia stuartii*, *Shigella Serogroups A, B y C*, *Xanthomonas maltophilia*, *Morganella morganii biogp 1*.

En función de las pruebas de biolixiviación de metales pesados realizadas en los sedimentos procedentes de la Laguna de Colta se obtuvieron concentraciones de metales en el lixiviado del tratamiento con bacterias que presentan valores de 3,501 ppm en Bario, 0,0612 ppm en Vanadio y 0,0236 ppm para Cobre, de igual manera las concentraciones en el lixiviado del tratamiento con hongos presenta valores de 1,522 ppm para Bario, 0,0989 ppm en Vanadio y 0,0385 ppm en Cobre, en base a los datos podemos decir que las bacterias y hongos nativos no tienen capacidad de biolixiviar los metales pesados presentes en el sedimento de la Laguna de Colta. Se recomienda hacer mayores estudios orientados a la reducción de metales pesados la obtención de consorcios fúngicos y bacterianos nativos con el objeto de mitigar los impactos ambientales generados al ser estos depositados en los sedimentos lacustres.

Palabras clave:<BIOLIXIVIACIÓN><METAL PESADO BARIO><METAL PESADO VANADIO><<METAL PESADO COBRE><SEDIMENTO LACUSTRE><CONSORCIO BACTERIANO><CONSORCIO FÚNGICO><LAGUNA DE COLTA><CANTÓN COLTA>

SUMMARY

This research aims to evaluate the effectiveness of native bacterial, and fungus consortium to bioleach heavy metals, specifically Barium, Vanadium and Copper, present in the sample sediment of Colta Lake from Colta Canton.

It was conducted a physicochemical and microbiological characterization of sediment, isolation and purification of bacterial and fungal strains by successive inoculation techniques. It was conducted a microscopic and macroscopic characterization of the strain, it was conducted a procedure enclosing several selection test such as: antagonism and identification of bacteria and fungi, for its subsequent mass and inoculation in the sediment, the process was carried out to obtain the native fungal consortium of the sediment coming from Colta Lake by using equipment such as: horizontal laminar flow chamber, autoclave, incubator, inductively coupled plasma (ICP), stove, among the principal ones.

After conducting the selection test, 10 strains of fungi forming the fungal consortium belonging to the following taxonomic groups: *Aspergillus*, *Aphanoascus*, *Penicillium*, *Asteromyces*, *Gliocladium* and *Lacellinopsis*, were collected, and a bacterial consortium of nine strains of the following groups: *Escherichia coli-inactive*, *Xenorhabdus nematophilys*, *Providencia stuartii*, *Shigella Serogroups A,B and C*, *Xanthomonas maltophilia*, *Morganella morganii biogp 1*.

According to the bioleaching tests of heavy metals carried out in sediments coming from Colta Lake, metal concentrations were obtained in the leachate of the treatment with bacteria showing values of 3,501 ppm Barium, Vanadium 0,0612 ppm and 0,0236 ppm to Copper likewise concentrations in leachate treatment with fungi has values of 1.522 ppm for Barium, Vanadium 0,0989 ppm and 0,0385 ppm Copper, based on the data it can be said that native bacteria and fungi are not capable of bioleach heavy metals in the sediment of Colta Lake . It is recommended to undertake further studies aimed to reduce the heavy metals in obtaining native fungal and bacterial consortium in order to mitigate adverse environmental impacts once these heavy metals are deposited in lake sediments.

Keywords: <BIOLEACHING> <BARIUM HEAVY METAL> <VANADIUM HEAVY METAL> <COPPER HEAVY METAL> <LAKE SEDIMENT> <BACTERIAL CONSORTIUM> <FUNGI CONSORTIUM> <COLTA LAKE> <COLTA CANTON>

INTRODUCCIÓN

En la actualidad diversas actividades antrópicas e industriales han desencadenado diversos escenarios de contaminación que han deteriorado los ecosistemas, en lo que concierne a medios lacustres son sistemas con mayor vulnerabilidad ya que soportan una alta intensidad de uso del medio, afectando directamente en su proceso de depuración natural.

La Laguna de Colta, uno de los centros turísticos más representativos de la Provincia de Chimborazo por su trascendencia histórica y cultural, se ha convertido en un medio vulnerable a la contaminación, ya que la actividad de dragado de sus sedimentos no contó con orientación y criterios especializados de análisis, provocando un impacto ambiental de considerables repercusiones en ámbitos relacionados con la biodiversidad.

La proliferación de totora, eutrofización y obstrucción de escorrentías han constituido una amenaza en la conservación de este recurso, incidiendo en el proceso de sedimentación y la acumulación de sustancias tóxicas en el mismo. En tal virtud, la alteración de su belleza paisajística se ha alterado, hoy peligrosamente el nivel del agua está descendiendo, y es evidente el deterioro del hábitat de los ulteriores de la laguna.

La biolixiviación se convierte en una de las técnicas más limpias para reducir la contaminación, mediante el aprovechamiento de microorganismos y su capacidad de transformar o movilizar metales. Por lo que, la presente investigación se fundamenta en la capacidad de la flora microbiana autóctona y su interacción con sustancias contaminantes, a fin de reducir el impacto de los mismos a nivel ambiental y social.

JUSTIFICACIÓN

La eutrofización en los recursos lenticos, incide directamente en el deterioro continuo de su ecosistema acuático; como consecuencia de diversas actividades naturales y antrópicas el exceso de nutrientes ocasiona el aumento de especies vegetales y animales, que al no descomponerse en su totalidad se depositan en los sedimentos de laguna, reflejando la mala calidad de los mismos; he aquí la situación que permite el desarrollo de la investigación.

La importancia de esta investigación se ve reflejada en la recuperación de los sedimentos de la laguna, mediante la aplicación de técnicas innovadoras e inocuas para el medio ambiente que en nuestro país aún no están siendo aplicadas, y que facilita la depuración natural de los sedimentos con bacterias y hongos nativos, sin alterar las características de la laguna y de los sedimentos.

En tal virtud se ha apostado por el uso de tecnologías que no constituyan una amenaza para los ecosistemas y las personas, ya que las técnicas de biorremediación representan en la actualidad técnicas limpias y eficaces para el proceso de descontaminación, basadas en el aprovechamiento de la actividad simbiótica de diversas especies bacterianas y fúngicas en la degradación de metales pesados hasta formas menos tóxicas.

El presente estudio, cuenta con el aval y financiamiento del Centro de Soluciones Técnicas y Transferencia Tecnológica Ambiental (CESTTA) de Riobamba, misma que impulsa el desarrollo de proyectos que contribuyan a la restauración de recursos acuáticos y aportar técnicamente en la investigación titulada "EFICACIA DE LOS CONSORCIOS BACTERIANOS Y FÚNGICOS NATIVOS EN LA REMOCIÓN DE METALES PESADOS POR BIOLIXIVIACIÓN DE LOS SEDIMENTOS DE LA LAGUNA DE COLTA DEL CANTÓN COLTA".

El desarrollo de la investigación contribuirá a que la población del Cantón Colta, de manera especial turistas nacionales y extranjeros, disfruten de un ambiente sano, así como también, mantener en equilibrio la flora y fauna del ecosistema acuático, a más de ser un aporte para alcanzar el desarrollo sostenible local y regional, mejorando así la calidad ambiental de la comunidad.

OBJETIVOS

GENERAL

- Evaluar la eficacia de la remoción de metales pesados por biolixiviación de los sedimentos de la laguna de Colta del Cantón Colta con el uso de consorcios bacterianos y fúngicos nativos

ESPECÍFICOS

- Determinar la concentración de metales pesados del sedimento de la laguna.
- Identificar las cepas fúngicas nativas para biolixiviar los metales pesados.
- Aplicar el método de pilas para biolixiviar los metales pesados.
- Determinar los parámetros de 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, 2011)

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, et al., 2005).

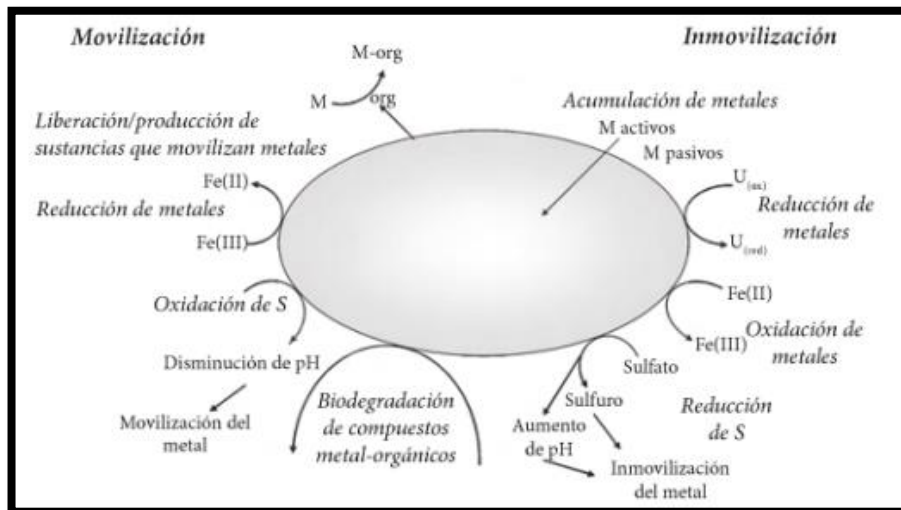


Ilustración. 1-1: Interacciones entre metales y microorganismos
Fuente: VOLKE, Tania., et al., 2005

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, et al., 2005).

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, GARCÍA, 2013).

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 *Aspergillus niger*, *Penicillium simplicissimum*, *Penicillium purpurogenum* (producción de metabolitos de bajo peso molecular), de *Rhodotorula rubra*, *Aspergillus thiooxidans* y *Aspergillus ferrooxidans* (MIDENCE, GARCÍA, 2013).

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, GARCÍA, 2013).

1.2.1.2. *Lixiviación Autotrófica (químico autotrófica)*

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

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, la presencia de estos se encuentra influenciada por dos factores principales la temperatura a la 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, 2004).

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 (MIDENCE, GARCÍA, 2013)

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, esféricos 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 (TORTORA, 2007).

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, 2011).

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, LUDEÑA, 2007).

1.3.2.2. Clasificación

El reino fungí 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 filios incluyen desde patrones de reproducción, hasta características básicas de la estructura. (ESPINOSA, LUDEÑA, 2007).

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, LUDEÑA, 2007).

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 *Aspergillus niger*, *Penicillium simplicissimum*, *Penicillium purpurogenum* está relacionada con la producción de metabolitos de bajo peso molecular, principalmente de ácidos orgánicos como el ácido glucónico ($C_6H_{12}O_7$), ácido pirúvico ($C_3H_4O_3$), ácido cítrico ($C_6H_8O_7$), ácido oxálico ($H_2C_2O_4$), ácido málico ($C_4H_6O_5$) y ácido succínico ($C_4H_6O_4$), mecanismo muy diferente al que presenta, *Aspergillus thiooxidans* y *Aspergillus ferrooxidans* (ESPINOSA, LUDEÑA, 2007).

1.4. Crecimiento microbiano

El término crecimiento microbiano hace referencia al número de células presentes, más no al tamaño que poseen las mismas.

Los microorganismos que se encuentran en la etapa de “crecimiento” aumentan en cantidad, a lo largo del “desarrollo” de los microorganismos también aumenta el tamaño de cada célula microbiana, pero este cambio no es muy perceptivo comparado con el crecimiento en animales y plantas (TORTORA, 2007).

1.4.1. *Requerimiento para el crecimiento microbiano*

Podemos dividir a los requerimientos microbianos en los grupos principales: físicos y químicos. Dentro de los requerimientos físicos tenemos el pH, la temperatura, la presión osmótica, la humedad; en cambio los requerimientos químicos se refieren a la presencia de nutrientes, la cantidad de carbono, nitrógeno, azufre, fósforo, oligoelementos y oxígeno entre los principales. (TORTORA, 2007).

1.4.1.1. *Requerimientos físicos*

Temperatura

En base a los límites de temperatura en que se desarrolla cada microorganismo se los clasifica en tres grupos:

- **Sicrófilos.**- microorganismos que presentan afinidad al frío
- **Mesófilos.**- microorganismos que se desarrollan a temperaturas moderadas.
- **Termófilos.**- microorganismos que son afines a temperaturas altas (TORTORA, 2007).

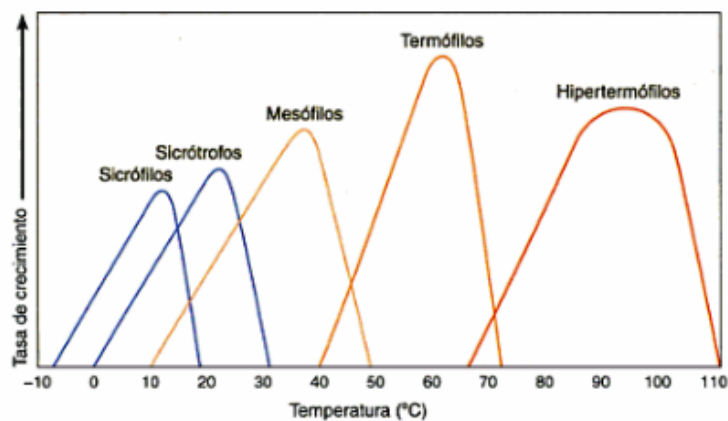


Ilustración. 2-1: Tipos de microorganismos según su temperatura
Fuente: TORTORA, Gerad., 2007

pH

La mayoría de bacterias se desarrolla mejor en un rango de pH cercano a la neutralidad con valores entre 6,5 y 7,5, pero no quiere decir que por debajo o encima de estos rangos no exista desarrollo de microorganismos.

Los hongos filamentosos y las levaduras presentan rangos más amplios de pH que las bacterias, por lo general está entre 5 a 6, pero al igual que las bacterias si existe presencia de hongos fuera de estos rangos (TORTORA,2007).

Presión Osmótica

Gran parte de los nutrientes que obtienen los microorganismos se encuentran disueltos en el agua circundante, los microorganismos como el resto de seres vivos necesita agua para crecer y estos están presentan un contenido de agua entre el 80-90%.

Si hay una elevada presión osmótica la célula elimina el agua, es por ello la importancia de mantener este controlado. En general los efectos de la presión osmótica se relacionan con el número de iones disueltos en un determinado volumen de solución (TORTORA, 2007).

Humedad

Es imprescindible para un buen desarrollo de las células vegetativas microbianas en los cultivos. Hay que prever el mantenimiento de estas condiciones mínimas en las estufas de cultivo a 35-37°C proporcionando una fuente adecuada de agua que mantenga la humedad necesaria para el crecimiento de los cultivos y evitar así que se deseque el medio (TORTORA, 2007).

1.4.1.2. Requerimiento químicos

Carbono

Este elemento constituye la estructura básica por la que está compuesta la materia viva, y es necesario para la formación de los compuestos orgánicos que constituyen una célula viva. Los organismos quimioautótrofos y fotoautótrofos obtienen su fuente de carbono del CO₂, mientras que los quimiheterótrofos la obtienen de materiales orgánicos como hidratos de carbono, proteínas y lípidos (TORTORA, 2007).

Nitrógeno, azufre y fósforo

Estos elementos son necesarios para los microorganismos ya que ayudan en el proceso de síntesis celular. Los microorganismos utilizan el nitrógeno para la formación del grupo amino de los aminoácidos de las proteínas, a pesar que ciertas bacterias tienen la capacidad de cubrir estos requerimientos a través de la descomposición de la materia orgánica en la que exista proteínas para poder reincorporar aminoácidos en proteínas. (TORTORA, 2007).

Oligoelementos

Los oligoelementos son elementos minerales como el Fe, Cu, Zn, Mo que los microorganismos requieren en pequeñas cantidades para poder realizar ciertas funciones enzimáticas, y las pueden obtener de manera natural en el agua, o en los medios de cultivo que se utilizan para su crecimiento (TORTORA, 2007).

Oxígeno

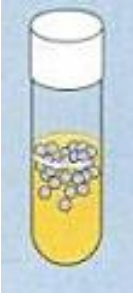




Los efectos del oxígeno sobre el crecimiento de diversos tipos de bacterias se explican en la siguiente Tabla:

Tabla. 1-1: Efectos del oxígeno sobre el crecimiento de diversos tipos de bacterias

	Aerobios estrictos	Aerobios facultativos	Anaerobios estrictos	Anaerobios aero tolerantes	Microaerófilos
Efectos del oxígeno sobre el crecimiento	Sólo crecen los aerobios; requieren oxígeno	Crecen aerobios y anaerobios, el crecimiento es mayor en presencia de oxígeno	Solo crecen anaerobios; el crecimiento cesa en presencia de oxígeno	Sólo crecen los anaerobios pero el crecimiento continúa en presencia de oxígeno	Sólo crecen los aerobios; requieren oxígeno en bajas concentraciones.

Continuará...

Continúa

<p>Crecimiento bacteriano en un tubo que contiene medio de cultivo sólido</p>					
<p>Explicación de los patrones de crecimiento</p>	<p>El crecimiento sucede sólo donde se difundieron concentraciones elevadas de oxígeno en el medio</p>	<p>El crecimiento es mejor donde hay mayor cantidad de oxígeno, pero se produce en todo el tubo</p>	<p>El crecimiento sucede sólo donde no hay oxígeno</p>	<p>El crecimiento sucede de manera uniforme, el oxígeno no tiene efecto</p>	<p>El crecimiento sucede sólo donde se difunden concentraciones bajas de oxígeno en el medio</p>
<p>Explicación de los efectos del oxígeno</p>	<p>La presencia de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa (SOD) permite que se neutralicen las formas tóxicas del oxígeno; pueden utilizar oxígeno.</p>	<p>La presencia de las enzimas catalasa y SOD permite que se neutralicen las formas tóxicas del oxígeno; pueden utilizar oxígeno</p>	<p>Carecen de enzimas para neutralizar las formas lesivas del oxígeno; no pueden tolerar oxígeno.</p>	<p>La presencia de una enzima SOD permite que sólo se neutralicen en parte las formas tóxicas del oxígeno, toleran el oxígeno.</p>	<p>Produce cantidades letales de formas tóxicas del oxígeno si se exponen al oxígeno atmosférico normal</p>

Realizado por: CÁCERES, A. 2015
Fuente: TORTORA, Gerad., 2007

1.4.2. Ciclo de crecimiento microbiano.

El ciclo de crecimiento microbiano consta de cuatro fases bien delimitadas, el tiempo de cada fase varía según el tipo de microorganismo, la familia a la que pertenece, entre otras características.

- **Fase de Latencia.**- período de transición para los microorganismos cuando son transferidos a una nueva condición, no hay incremento en el número de células, pero si gran actividad en el metabolismo.
- **Fase de Crecimiento Exponencial.**-Crecimiento del microorganismo ocurre de forma exponencial,
- **Fase Estacionaria.**- ocurren las limitaciones del crecimiento, ya sea por agotamiento de algún nutriente esencial o por acción de algún toxico.
- **Fase de Muerte.**- se produce una disminución del número de células viables. (TORTORA, 2007).

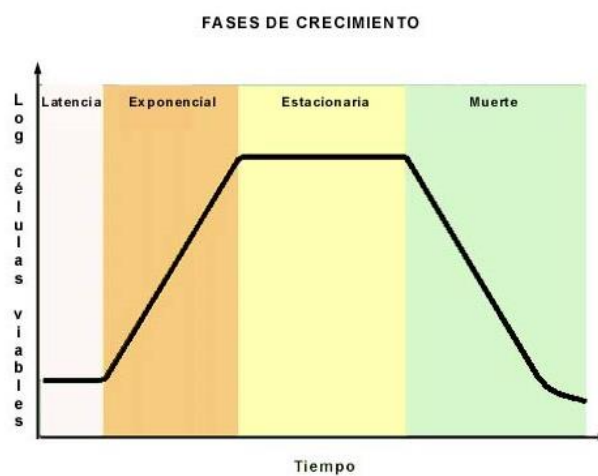


Ilustración. 3-1: Fases de crecimiento microbiano
Fuente: TORTORA, Gerad., 2007.

1.5.Sedimentos

1.5.1. *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 (ARCHE, 2010)

1.6. 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, VALDÉS, 2012).

1.6.1. 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, et al., 2005):

1.6.1.1. *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.

1.6.1.2. *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 (VOLKE, et al., 2005)

1.6.2. *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, 2011).

1.6.2.1. *Cambio en el estado de oxidación.*

Ciertos metales como el Tc (VII), U (VI), 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.

1.6.2.2. *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.

1.6.2.3. *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 (YAGNENTKOVSKY, Nadia., 2011).

CAPÍTULO II

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Descripción del área de estudio

La Laguna de Colta se encuentra ubicada al noroccidente de la Provincia de Chimborazo, en el Cantón Colta, a 17 Km de la ciudad de Riobamba. Tiene un área de 2,5 Km de largo y 1 Km de ancho. Alberga especies nativas de aves y una gran variedad de peces de distintos colores (SERRANO, 2014).

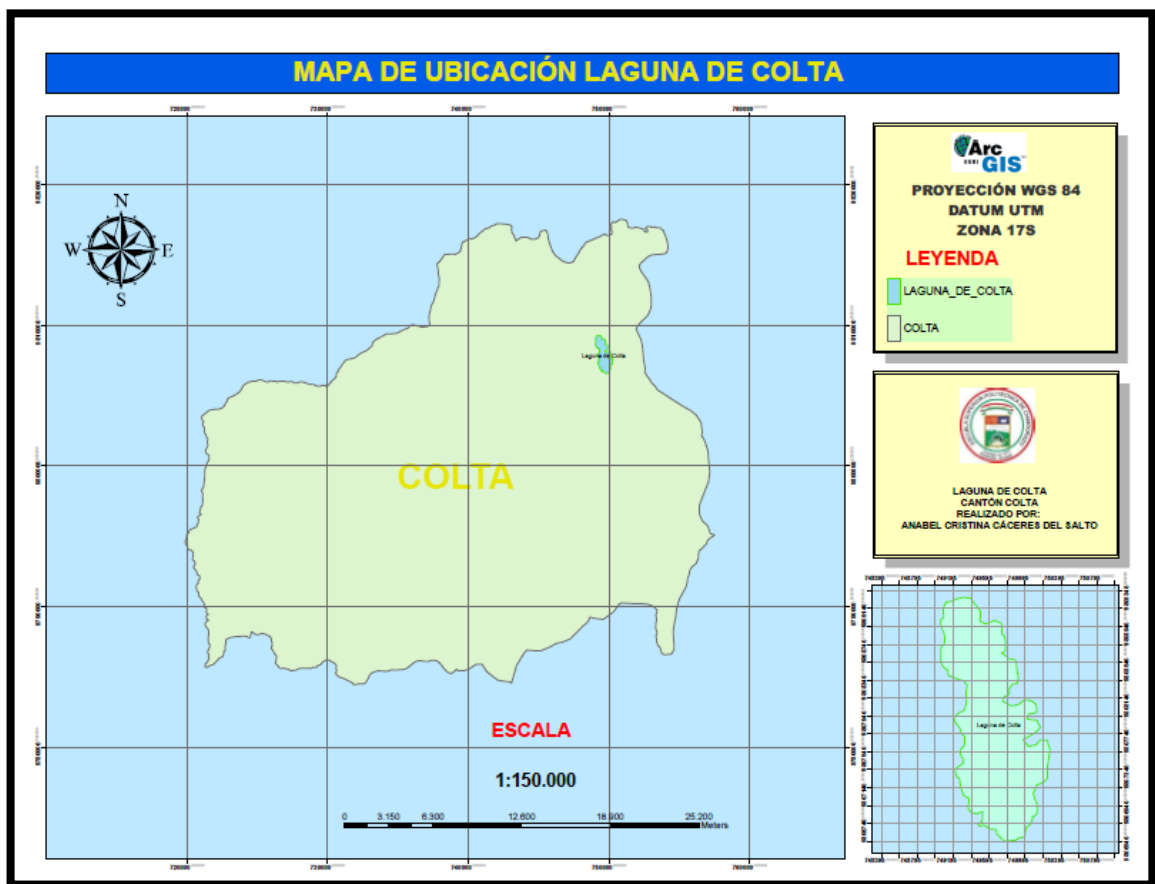


Ilustración. 1-2: Mapa ubicación Laguna de Colta

Realizado por: CÁCERES, A. 2015

2.1.2. Delimitación del área de estudio.

La Laguna cuenta con un área de aproximadamente 204 Ha., dividida en 2 parroquias, Santiago de Quito con un área de 753 Ha., y Sicalpa con 1396 Ha., ambas pertenecen al cantón Colta (SERRANO, 2014).

2.1.2.1. Área de influencia directa

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

Tomando en consideración la actividad antropogénica moradores del sector, así como de los turistas que visitan la laguna cuyas actividades influyen considerablemente 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 0749611 / 9808304 correspondiente a la parte central de la laguna, misma que presenta contaminación por metales Ba, Cu y V que son de interés para la investigación.

2.2. Descripción de área de investigación

2.2.1. Geología

La Soil Taxonomy de la USDA clasifica al suelo en 4 órdenes los cuales son:

- Inceptisoles
- Molisoles
- Entisoles
- Histosoles.

Inceptisol, presente en el 64% del Cantón son suelos de origen volcánico reciente, con débil horizonte que es típico de zonas recientemente desglaciadas.

El tipo Molisol, con un porcentaje del 33% estrato rico en materia orgánica y minerales, presenta un espesor considerable, es de color negro y denso.

Entisoles, ocupan el 2 % del cantón, suelos con grandes acumulaciones de materia orgánica sin evolucionar.

Los Histosoles, correspondiente al 1% del suelo del Cantón se forman por aglomeración de materia orgánica en cuencas con abundante presencia de agua o climas fríos y húmedos que impiden que los restos vegetales y animales se descompongan (SERRANO, 2014).

2.2.2. Geomorfología

Debido a la heterogeneidad del terreno, así como la presencia de pendientes escarpadas y fuertes (88%) que presenta el Cantón, los suelos del sector presenta restricciones para el desarrollo de actividades productivas como la agricultura, ganadería, y con apenas el 11% correspondiente a pendiente suave, ubicado en el sector de los Gatazos, aquí se impulsa principalmente la agricultura, cuyo producto principal es el brócoli. (SERRANO, 2014).

2.2.3. Clima y meteorología

La Tabla. 1-2: Datos meteorológicos del Cantón Colta, muestra los datos más relevantes sobre el clima y la meteorología del sector.

Tabla. 1-2: Datos meteorológicos del Cantón Colta.

Parámetro	Descripción
Precipitación	Estación Meteorológica de Cajabamba: precipitación anual de 717 mm Estación Meteorológica de Guaslán: evaporación media anual de 865 mm
Temperatura	Media al año es de alrededor de 11,5 °C.
Vientos	Julio y Septiembre son los meses con mayor presencia de vientos → 2,6 m/s
Humedad Relativa	73 %

Realizado por: CÁCERES, A. 2015
Fuente: SERRANO, P.

2.2.4. Hidrogeología




De los páramos del Cantón Colta nacen dos causes, el del Pastaza con una extensión de 45267,73 Ha y la del Guayas con un extensión de 37791,61 Ha (SERRANO, 2014).

2.2.5. Flora y fauna

2.2.5.1. Flora representativa






En la siguiente tabla se muestran las especies de flora que se pueden observar en la Laguna de Colta.

Tabla. 2-2: Flora de la Laguna de Colta

Nombre científico	Nombre Común	Familia	Fotografía
<i>Chuquiraga jussieui</i>	Chuquirahua	<i>Asteraceae</i>	
<i>Spartium junceum</i>	Retama	<i>Fabaceae</i>	
<i>Polytrichum commune</i>	Musgo	<i>Polytrichaceae</i>	






Continuará...

Continúa

<i>Cortaderia rudiunculastap</i>	Sigse	Cauco	
<i>Taraxacum officinale</i>	Taraxaco	<i>Asteraceae</i>	
<i>Baccharis dracunculifolia</i>	Chilca	<i>Asteraceae</i>	
<i>Tilia platyphyllos</i>	Tilo	<i>Tilíaceas</i>	
<i>Werneriasp</i>	Berro	Compositae	

Continuará...

Continúa

<i>Borago officinalis</i>	Borraja	<i>Boraginaceae</i>	
<i>Agave americana</i>	Cabuya	<i>Agaveceae</i>	
<i>Prunus serótina</i>	Capulí	Rosaceae	
<i>Rumex crispus</i>	Lengua de vaca	<i>Polygonaceae</i>	
<i>Scirpus californicus</i>	Totora	Cyperaceae	

Continuará...

Continúa

<i>Calceolaria sp.</i>	Zapatitos	<i>Scrophulariaceae</i>	
------------------------	-----------	-------------------------	--




Realizado por: CÁCERES, A. 2015

Fuente: SERRANO, P.

2.2.5.2. Fauna representativa




En la siguiente tabla se muestran la fauna que se pueden observar en las cercanías de la Laguna de Colta

Tabla. 3-2: Fauna de la laguna de Colta

Nombre científico	Nombre Común	Familia	Fotografía
<i>Zonotrichia capensis</i>	Chingolo	<i>Emberizidae</i>	
<i>Oxyura ferruginea</i>	Pato zambullidor	<i>Anatidae</i>	
<i>Anas cyanoptera</i>	Cerceta canela	<i>Anatidae</i>	

Continuará...

Continúa

<p><i>Podilymbus podiceps</i></p>	<p>Zambullidor piquipinto</p>	<p><i>Podicipedidae</i></p>	
<p><i>Tachybaptus dominicus</i></p>	<p>Zambullidor menor</p>	<p><i>Podicipedidae</i></p>	
<p><i>Calidris bairdii</i></p>	<p>Playero de bairdii</p>	<p><i>Scolopacidae</i></p>	
<p><i>Tringa flavipes</i></p>	<p>Playero patiamarillo menor</p>	<p><i>Scolopacidae</i></p>	

Realizado por: CÁCERES, A. 2015

Fuente: SERRANO, P.

2.2.6. Población

En la zona urbana existe una población de 2 313 habitantes, que corresponde al 5% del total de la población, con respecto al 95% que corresponde a la población de la zona rural con un total de 42 658 habitantes (SERRANO, 2014).

2.3. Diseño experimental

La presente investigación está sujeta a la manipulación de variables, con el objetivo de evaluar la actividad simbiótica de consorcios bacterianos y fúngicos nativos controlando las variables que pueden afectarlos (pH, Humedad, Temperatura, Cantidad de nutrientes).

2.3.1. Tipo de diseño

La investigación se basa en las siguientes características, presenta un nivel descriptivo, la secuencia es de tipo transversal, el enfoque es cuantitativo, se busca generar conocimiento aplicando un método experimental.

Basado en esto, se aplica un diseño de cronologías múltiples, con la selección no aleatoria de sujetos, expresándola de la siguiente manera:

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.

2.3.2. Tratamientos

El sedimento contaminado proviene de la Laguna de Colta, se tomó un peso total de 15 kg que fueron distribuidos en 3 grupos experimentales colocados en tres recipientes plásticos, en los que se aplicó los siguientes tratamientos:

TB: Sedimento inoculado con consorcios bacterianos nativos.

TH: Sedimento inoculado con consorcios fúngicos nativos.

2.3.3. Variables de control

A lo largo del proceso de la investigación, es importante controlar ciertas variables que pueden influenciar en los microorganismos afectando la biolixiviación de los metales:

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

CAPÍTULO III

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Procesamiento de muestras biológicas

Los hongos presentes en las muestras de sedimentos de la Laguna de Colta requieren nutrientes básicos que son aportados por los medios de cultivo no selectivos como es el caldo nutritivo.

Materiales equipos y reactivos

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

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, dispensar en cajas petri y dejar solidificar.

- c. Homogenizar la muestra de sedimento, pesar la cantidad necesaria y colocar en el frasco de agua de peptona estéril correspondiente a la primera dilución y agitar.
- d. Tomar una alícuota de la primera dilución y transferir al tubo correspondiente a 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 esparcir sobre la superficie del agar, usando el asa bacteriológica
- f. Incubar a 27°C, a partir del quinto día se observa crecimiento.

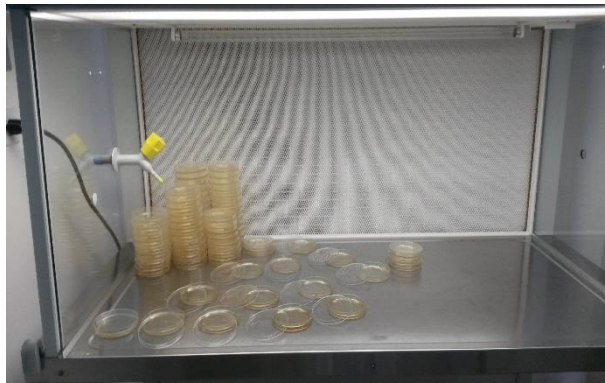


Ilustración. 1-3: Preparación de cajas petri con agar
Realizado por: CÁCERES, A. 2015

3.2. Aislamiento y purificación de las cepas fúngicas

Para la obtención de las cepas fúngicas aptas para el proceso de biolixiviación es necesario purificar mediante un proceso de aislamiento consecutivo.

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

Procedimiento

- a. Preparamos el agar nutritivo, esterilizamos en el autoclave y distribuimos en cajas petri hasta que se solidifiquen.
- b. Con ayuda del sacabocados obtenemos una porción del hongo y sembramos en el medio de cultivo. Repetimos el proceso hasta obtener el crecimiento de la cepa pura.
- c. Verificamos que no exista la presencia de otro hongo.



Ilustración. 2-3: Aislamiento y purificación de cepas fúngicas
Realizado por: CÁCERES, 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 ser seleccionadas para conformar el consorcio en un tiempo determinado. Se realiza una resiembra mensualmente para la conservación de las cepas y evitar el envejecimiento.

Materiales Equipos Y Reactivos

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

Procedimiento

- a. Agregamos los reactivos de tinción sobre el porta objetos
- b. Tomamos una porción de la cepa con la cinta pegante y la colocamos en el porta objetos.
- c. Observamos las características microscópicas de la cepa fúngica 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.

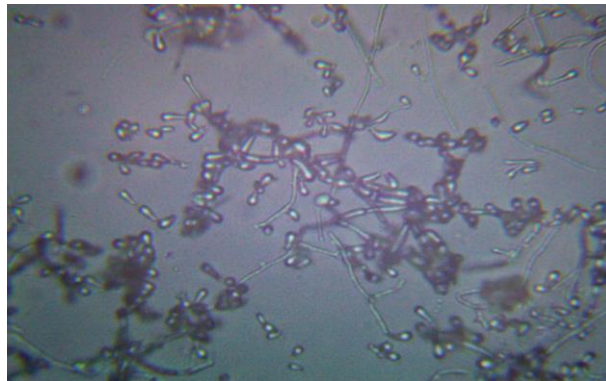


Ilustración. 3-3: Observación de placas al microscopio
Realizado por: CÁCERES, A. 2015

3.4. Conservación de cepas fúngicas

La conservación se realizó mediante la elaboración de un banco primario, mismo que permite conservar las cepas por largos periodos de tiempo.

Materiales, equipos y reactivos

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

Procedimiento

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



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

3.5. Preparación del inóculo líquido fúngico

El inóculo líquido de hongos es la sustancia que se colocará en el sedimento para aumentar la carga fúngica del mismo, al ser líquido permitirá que las hifas tengan una mayor superficie de acción con una sola aplicación.

Materiales, equipos y reactivos

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

Procedimiento

- Preparamos una solución de afrecho de trigo con agua destilada y esterilizamos.
- Con ayuda del sacabocados obtenemos 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.
- Agitamos hasta observar la formación de conglomerados blancos.



Ilustración. 5-3: Inóculo fúngico
Realizado por: CÁCERES, A. 2015

3.6. Reactivación de cepas bacterianas

La reactivación de las cepas bacterianas se realiza a través de la preparación de un caldo nutritivo que contiene los nutrientes necesarios para que las bacterias se activen.

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

Procedimiento

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



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

3.7. Preparación del inóculo líquido bacteriano

El inóculo líquido bacteriano es la sustancia que se colocará en el sedimento para aumentar la carga de bacterias, así como colocar las bacterias de interés.

Materiales, equipos y reactivos

- Matraces de 1000 ml.
- Motores de pecera.
- $MgSO_4$
- $NaCl$
- NH_4Cl
- KH_2PO_4
- Peptona
- Azúcar.
- Gelatina si sabor
- Agua destilada
- Cepas bacterianas

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. Colocar en el sedimento

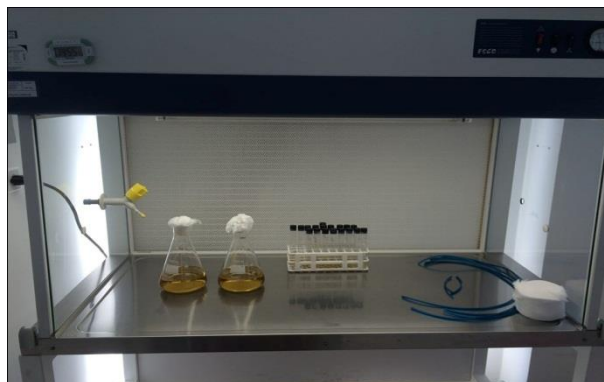


Ilustración. 7-3: Preparación del inóculo bacteriano
Realizado por: CÁCERES, A. 2015



Ilustración. 8-3: Inóculo Bacteriano
Realizado por: CÁCERES, A. 2015

3.8. Métodos analíticos

3.8.1. *Determinación de metales (V, Ba, Cu) por ICP*

Una fuente de ICP está constituido por una corriente de flujo de un gas, específicamente el argón que es ionizado por un campo de radiofrecuencias que oscila a 27,1 MHz, este campo se encuentra enlazado inductivamente al gas ionizado a través de una bobina refrigerada con agua que rodea una “lámpara” de material de cuarzo cuya función es dar soporte y confinar el plasma. Gracias a las elevadas temperaturas del plasma (6 000 a 8 000 °K) se logra una excitación eficaz de la emisión atómica, permitiendo bajos niveles de detección para muchos elementos, y esto conjuntamente con extenso recorrido dinámico lineal se logra una eficaz detección de multielementos. Método de referencia: Standards Methods No. 3120 A.

Procedimiento para análisis de materia en mix de metales

- a. Pesar el filtro.
- b. Filtrar 100 mL de la solución.
- c. Secar el filtro hasta peso constante.
- d. Ver la diferencia de peso.
- e. Colocar el filtro en el tubo de digestión.
- f. Agregar de Ácido Nítrico p.a 1:1.

- g. Someter a digestión acelerada por microondas.
- h. Esperar que se enfríe.
- i. Filtrar y aforar en un balón.
- j. Medir en el equipo ICP
- k. Realizar los cálculos respectivos.

Procedimiento para análisis de sedimento

- l. Secar el sedimento en estufa.
- m. Triturar tamizar y pesar aproximadamente 0,5 g
- n. Colocar el sedimento seco en el tubo de digestión.
- o. Agregar de Ácido Nítrico p.a 1:1.
- p. Someter a digestión acelerada por microondas.
- q. Esperar que se enfríe.
- r. Filtrar y aforar en un balón de 50mL.
- s. Medir en el equipo ICP
- t. Realizar los cálculos respectivos.

3.8.2. *Determinación de pH*

La medición de pH de un suelo o de sedimento, se realiza con la ayuda de un potenciómetro y electrodos de vidrio, el principio se fundamenta en la medida del potencial eléctrico producido en la membrana de vidrio del mismo, que es producto de las actividades de los iones hidrógeno a ambos lados de la membrana. Método de referencia: EPA 9045 D. 2004

3.8.3. *Determinación de la humedad*

Se determina el contenido de humedad gravimétrico del suelo, secando la muestra por medio de la aplicación directa de calor. Método de referencia: Norma ASTM D 4959

3.8.4. *Determinación de temperatura*

Los átomos y moléculas por los que está constituida una sustancia no siempre se mueven a velocidad constante, motivo por el cual existe en las moléculas un rango de energía, conocida como energía de movimiento.

La temperatura se define como la medición del calor o energía térmica de las partículas presentes en una sustancia, como se mide su movimiento medio su valor depende del tamaño de las partículas en un objeto y no del número de partículas.

3.9. Métodos microbiológicos

3.9.1. *Determinación de carga bacteriana*

La determinación de la carga bacteriana se la efectúa por medio de la preparación de varias diluciones continuas o sucesivas en un medio de cultivo general nutritivo, para luego sembrarlo en placas petri y conteo.

CAPITULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis físico químico del sedimento

A partir de los resultados obtenidos del análisis físico químico de las muestras recolectadas en la Laguna de Colta, podemos evidenciar que los sedimentos contienen los metales de interés.

Tabla. 1-4: Caracterización Físico Química del Sedimento

PARÁMETROS	UNIDAD	RESULTADO
Hidrocarburos Totales	mg/Kg	315,82
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos	mg/Kg	0,30
*Bario	mg/Kg	291,63
*Vanadio	mg/Kg	95,91
*Cobre	mg/Kg	77,97
*Nitrógeno Total	%	0,63
*Fósforo Total	mg/Kg	988,20
*Potasio	mg/Kg	2314,07
Potencial de Hidrógeno	Unidades de pH	7,08
*Humedad	%	82

Realizado por: CÁCERES, A. 2015

Fuente: LAB-CESTA

4.2. Identificación de cepas bacterianas

SERRANO, P. en la investigación denominada “Obtención del Consorcio Bacteriano Nativo del Sedimento de la Laguna de Colta del Cantón Colta” en la prueba de identificación obtiene las siguientes bacterias.

Tabla. 2-4: Cepas bacterianas de la laguna de Colta.

CÓDIGO DE LA CEPA	NOMBRE CIENTÍFICO	Gram	Forma
P5	<i>Escherichia coli-inactive</i>	-	Irregular
P6	<i>Xenorhabdus nematophilys</i>	-	Irregular
P10	<i>Providencia stuartii</i>	-	Regular
P11	<i>Shigella Serogroups A,B y C</i>	-	Irregular
P12	<i>Xanthomonas maltophilia</i>	-	Irregular
P13	<i>Morganella morganii biogp 1</i>	-	Irregular
P17	<i>Escherichia coli-inactive</i>	-	Irregular
P18	<i>Providencia stuartii</i>	-	Irregular
P24	<i>Escherichia coli-inactive</i>	-	Irregular

Realizado por: CÁCERES, A. 2015

Fuente: SERRANO, P. 2014

Mediante la aplicación de pruebas que miden el poder degradativo, y pruebas de antagonismo a las que fueron sometidas las cepas encontradas en la Laguna de Colta se logró formar el consorcio bacteriano nativo del sedimento de la laguna comprendido por 9 cepas bacterianas.



Ilustración. 1-4: Pruebas de antagonismo en bacterias

Fuente: SERRANO, P. 2014

4.3. Identificación de cepas fúngicas

La identificación de las cepas fúngicas se la realizó mediante la técnica de cinta pegante que nos permite observar las características microscópicas de las colonias, esta constituye una de las técnicas más usadas debido a que se conserva la yuxtaposición original de las esporas y segmentos de hifas, y sus estructuras fúngicas no presentan alteraciones significativas. Esta técnica requiere de una persona capacitada en la identificación de las hifas y las esporas de cada muestra que posteriormente son comparadas con una base de datos conociendo así el género de la cepa fúngica.

En la **Tabla.3-4:** Características macroscópicas y microscópicas de las cepas fúngicas se describe el código de cada una de las cepas aisladas, el género y las características morfológicas.

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

CÒDIGO	GENERO	COLOR DE LA COLONIA	FORMA CELULAR	ESPORULACIÓN	HIFAS	CRECIMIENTO
LC - A	<i>Aspergillus</i>	Centro: Amarillo Periferia: Blanco Verdoso	Filamentoso	Ascosporas Conidióforo	Tabicular	Lento
LC - B	<i>Aphanoascus</i>	Centro y Periferia: Blanco	Filamentoso	Conidióforo	Septadas	Lento
LC - C	<i>Penicillium</i>	Centro: Gris verdoso Periferia: Blanco	Filamentoso	Conidióforo	Septadas Hialinas	Rápido
LC - D	<i>Penicillium</i>	Centro: Verde-azulado Periferia: Blanco	Filamentoso			Lento
LC - E	<i>Penicillium</i>	Centro: Blanco-Grisáceo Periferia: Blanco	Filamentoso			Rápido
LC - F	<i>Asteromyces</i>	Centro: Blanco-Rosáceo Periferia: Blanco	Filamentoso	Conidióforo	Septadas	Rápido
LC - G	<i>Penicillium</i>	Centro: Negro- azulado Periferia: Rosado pálido	Filamentoso	Conidióforo	Septadas Hialinas	Lento
LC - H	<i>Gliocladium</i>	Centro: Blanco café Periferia: Blanco	Filamentoso	Conidióforo	Septadas Hialinas	Lento
LC - I	<i>Lacellinopsis</i>	Centro: Café-verdoso Periferia: Blanco-amarillento	Filamentoso	Ascosporas	Septadas	Lento
LC - J	<i>Aspergillus</i>	Centro: Negro Periferia: Blanco	Filamentoso	Ascosporas Conidióforo	Septadas Hialinas	Rápido

Realizado por: CÁCERES, A. 2015

Es importante mencionar que en su mayoría las cepas encontradas pertenecen al género *Penicillium*, de las 10 cepas encontradas en la Laguna con ayuda de personal experto fue posible identificar la especie de dos de ellas entre las que tenemos:

- LC – H *Gliocladium virens*, esta cepa tornó el agar nutritivo de un color café, y puede ser que esta segregue algún tipo de antibiótico. Se conoce que cepas de *Gliocladium virens* producen un antibiótico de amplio espectro llamado Gliotoxina que mata a muchos microorganismos patógenos del suelo. En la investigación “CONTROL DE CALIDAD EN LA PRODUCCIÓN DEL HONGO *Gliocladium virens*, PATÓGENO DE *Anopheles albimanus* (Wiedemann 1820), VECTOR DEL PALUDISMO EN MÉXICO “se menciona su potencial como bioinsecticida. (Castillo et al, 2013)
- LC – J *Aspergillus niger*, considerada la especie más común del género *Aspergillus*, dentro de los usos que se le da a esta cepa podemos mencionar la obtención de productos químicos como el ácido cítrico, ácido glucónico así como también de enzimas como la glucoamilasa, galactosidasa.

4.4. Prueba de biolixiviación de metales en cada uno de los inóculos conformados

4.4.1. Inóculo bacteriano y fúngico

El consorcio bacteriano inoculado en el sedimento fue conformado por las 9 cepas bacterianas nativas encontradas en la laguna, *Escherichia coli-inactive*, *Xenorhabdus nematophilys*, *Providencia stuartii*, *Shigella Serogroups A, B y C*, *Xanthomonas maltophilia*, *Morganella morganii biogp 1*, estas fueron previamente reactivadas, masificadas e inoculadas en el sedimento. En esta prueba se espera que las bacterias trabajen de manera simbiótica para oxidar los compuestos minerales presentes en el sedimento y por tanto lixiviar (disolver) los valores metálicos contenidos en el sedimento.

El consorcio fúngico inoculado en el sedimento está conformado por 10 cepas, correspondientes a 6 géneros *Asteromyces*, *Aspergillus*, *Aphanoascus*, *Gliocladium*, *Lacellinopsis*, *Penicillium* para proceder a la inoculación de esto se preparó un inóculo líquido, a diferencia de las bacterias los hongos no realizan un proceso de oxidación microbiana sino más bien utilizan su metabolismo microbiano como fuente de ácidos que disuelven directamente el metal.

Cada uno de los inóculos se los colocó en 5 lb de sedimento, al mismo que se le añadió Urea para cubrir la demanda de nutrientes de los microorganismos y aserrín que mejora la textura del sedimento, al homogenizar estos compuestos se formó una biopila en un recipiente con una pendiente para recolectar el lixiviado, se coloca el inóculo y posteriormente se realiza la medición del lixiviado en 77 días.

4.4.2. *Biolixiviación en pilas*

Para comprobar el potencial de biolixiviación de metales pesados en el sedimento se inocula los consorcios bacterianos y fúngicos en la biopilas y se controla el proceso por un lapso de 77 días, esperando que los metales de interés sean liberados en el lixiviado por efecto de las actividades de los microorganismos. Se verifica la capacidad de los consorcios midiendo la concentración de metales pesados presentes en el lixiviado recogido al final de los 77 días, mismo que fue obtenido a partir del día 14 posterior a la inoculación.



Ilustración. 2-4: Biopilas de lixiviación
Realizado por: CÁCERES, A. 2015

4.5. Análisis de datos del diseño experimental

4.5.1. *Obtención del sedimento para pruebas de biolixiviación*

La población total (N) a estudiar corresponde a 15 kg de sedimento proveniente de la Laguna de Colta, este fue homogenizado para distribuirlo equitativamente en los 3 grupos experimentales, los dos en los que se aplicará el tratamiento y el grupo control.

4.5.2. Caracterización y parámetros de análisis del sedimento

En la caracterización físico química inicial de los sedimentos se consideró el análisis de los siguientes parámetros, Hidrocarburos Totales de Petróleo (TPH), Metales Pesados de interés Bario (Ba), Vanadio (V), Cobre (Cu), Nutrientes Nitrógeno (N), Fósforo (P) y Potasio (K), además del potencial hidrógeno (pH), y el contenido de Humedad.

Los parámetros que serán controlados frecuentemente a lo largo de los 77 días, son pH, humedad, y temperatura, así como también la carga bacteriana y fúngica se controlaron antes y después de cada inoculación.

4.5.3. Análisis de las unidades de control

La concentración de los metales de interés se presenta en la siguiente tabla:

Tabla. 4-4: Concentración de metales pesados en el sedimento

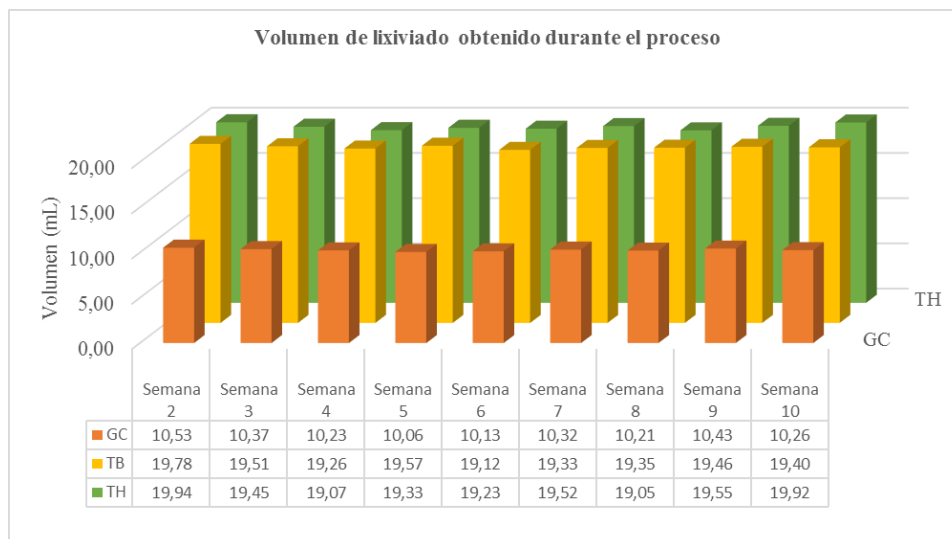
Parámetro	Unidad	Resultado
Ba	mg/kg	291,63
V	mg/kg	95,91
Cu	mg/kg	77,97

Realizado por: CÁCERES, A. 2015

Fuente: LAB-CESTTA

En nuestro país no existe una Norma que controle la concentración de metales pesados en sedimentos lacustres, es por ello, que la eficacia se determina en función de la concentración del metal en el lixiviado obtenido.

En la Gráfica. 1-4: Volumen de lixiviado obtenido se muestra el volumen total de lixiviado obtenido en los tres tratamientos aplicados:



Gráfica. 1-4: Volumen de lixiviado obtenido del sedimento
Realizado por: CÁCERES, A. 2015

La Tabla. 5-4: Volumen de lixiviado recolectado semanalmente, muestra los volúmenes obtenidos semanalmente, por un periodo de 10 semanas. En el Grupo Control (GC), se obtuvo un volumen total de 92,54 mL, en el Tratamiento con Bacterias (TB) 174,78 mL, y finalmente el Tratamiento con Hongos en el que se obtuvo un volumen final de 175,06 mL.

Tabla. 5-4: Volumen de lixiviado recolectado semanalmente

Grupo experimental	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6	Semana 7	Semana 8	Semana 9	Semana 10	Total (mL)
GC	10,53	10,37	10,23	10,06	10,13	10,32	10,21	10,43	10,26	92,54
TB	19,78	19,51	19,26	19,57	19,12	19,33	19,35	19,46	19,40	174,78
TH	19,94	19,45	19,07	19,33	19,23	19,52	19,05	19,55	19,92	175,06

Realizado por: CÁCERES, A. 2015

Se determinó la concentración de metales presentes en el lixiviado de los dos grupos experimentales y en el grupo control posterior a los 77 días que duró el tratamiento, los valores se muestran en la siguiente tabla:

Tabla. 6-4: Concentración de metales en los lixiviados

Parámetro	Concentración A(ppm)	Concentración B(ppm)
	Lixiviado Hongos	Lixiviado Bacterias
Ba	1,522	3,501
V	0,0989	0,0612
Cu	0,0385	0,0236

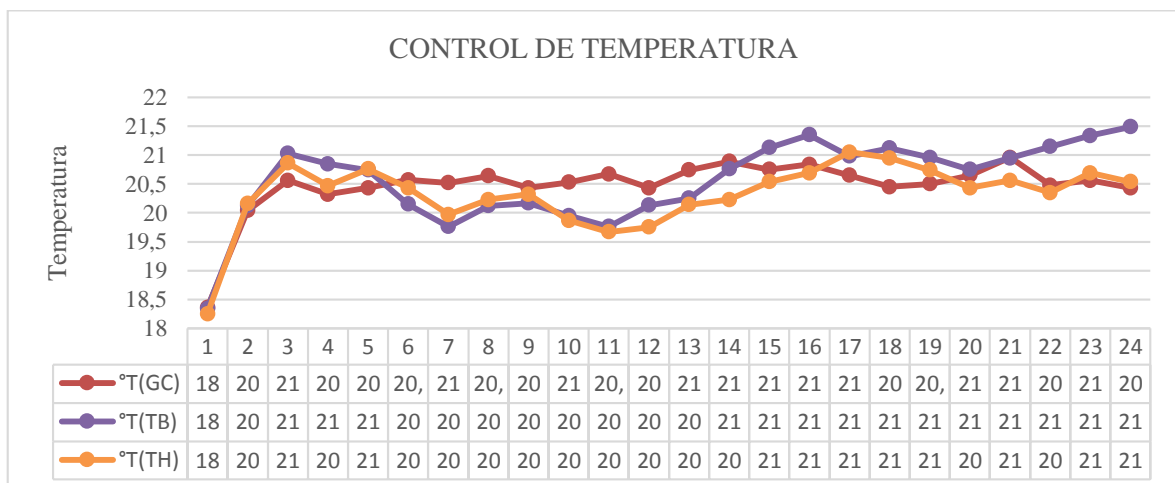
Realizado por: CÁCERES, A. 2015

4.6. Seguimiento de variables de control

4.6.1. Temperatura y humedad en el proceso de biolixiviación

Se realizó controles de temperatura y humedad por un lapso de 77 días, tiempo que duró el proceso de lixiviación **Anexo K: REGISTRO DE TEMPERATURA, pH Y HUMEDAD DURANTE EL PROCESO DE BIOLIXIVIACIÓN.**

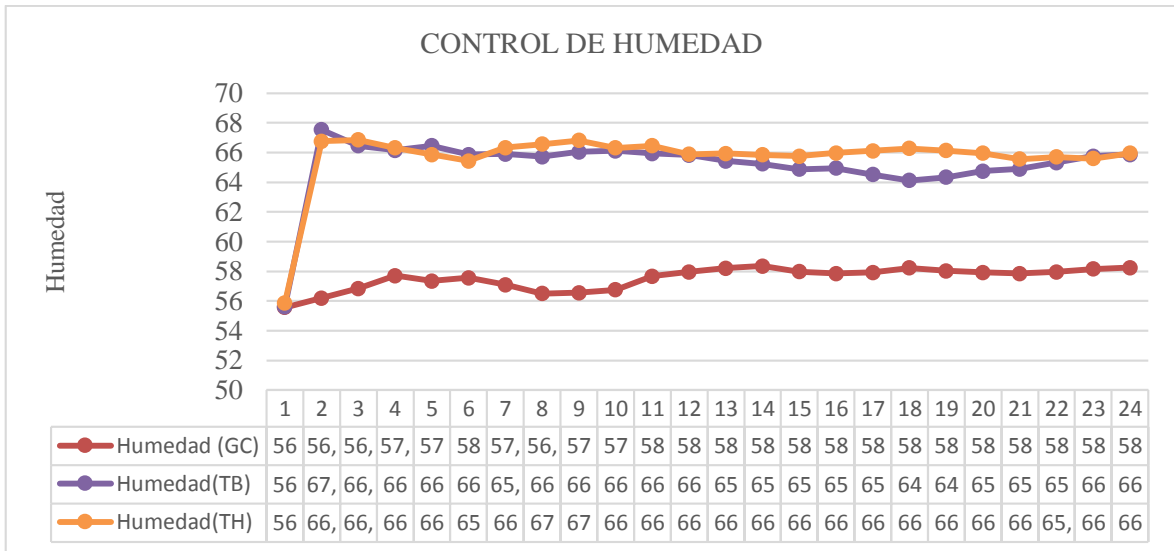
La temperatura en las unidades experimentales como se observa en el **Gráfica. 2-4:Control de Temperatura** presenta una temperatura inicial en el Grupo Control °T(GC) de 18,36°C y una temperatura final de 20,43°C dándonos una temperatura promedio a lo largo de proceso de 20,47°C, el Tratamiento Bacteriano °T(TB) presenta una temperatura inicial de 18,34°C y una temperatura final de 21,49°C dándonos una temperatura promedio a lo largo de proceso de 20,55°C, finalmente el Tratamiento Fúngico °T(TF) presenta una temperatura inicial de 18,25°C y una temperatura final de 20,31°C dándonos una temperatura promedio de 20,31°C.



Gráfica. 2-4: Control de Temperatura

Realizado por: CÁCERES, A. 2015

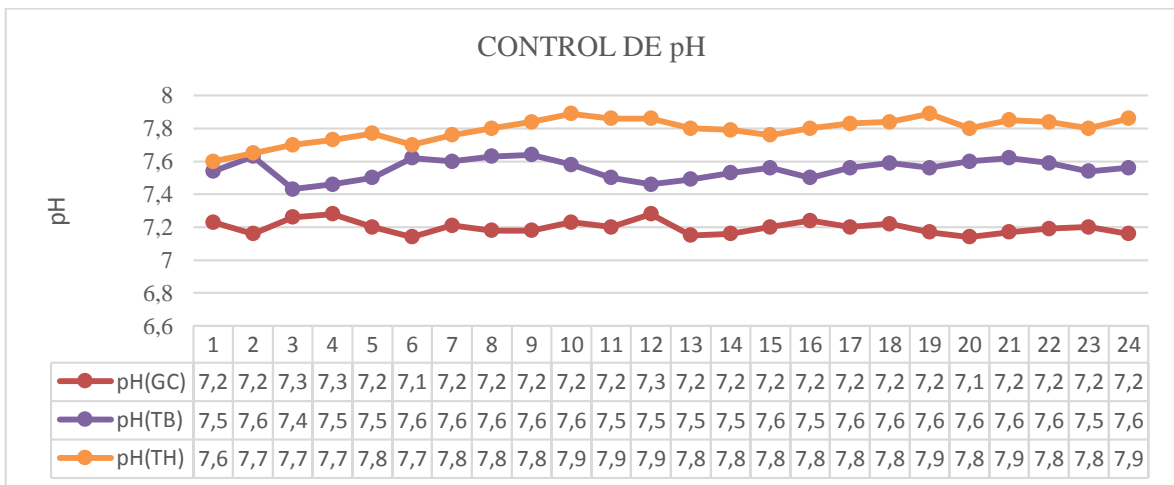
De igual manera los controles de Humedad en las tres unidades experimentales como se observa en el **Gráfica. 3-4:Control de Humedad**, el Grupo Control Humedad(GC) tiene una humedad inicial de 55,57 y una humedad al final del proceso de 58,24 lo que nos da un promedio de 57, el Tratamiento Bacteriano Humedad(TB) presenta una humedad inicial de 55,63 y una humedad final de 65,87 dándonos una humedad promedio a lo largo de proceso de 65,15, finalmente el Tratamiento Fúngico Humedad(TF) presenta una humedad inicial de 55,87 y una humedad final de 65,95 dándonos una humedad promedio de 65,67.



Gráfica. 3-4: Control de Humedad
Realizado por: CÁCERES, A. 2015

4.6.2. pH durante el proceso de biolixiviación

El pH en las unidades experimentales como se observa en el **Gráfica. 4-4:**Control de pH, el Grupo Control pH(GC) presenta un pH inicial de 7,23 y al final del proceso presenta un valor de 7,16 lo que nos da un valor promedio a lo largo del proceso de 7,19, en el Tratamiento Bacteriano pH(TB) inicia con un pH de 7,54y un pH final de 7,56 dándonos un promedio de 7,55, finalmente el Tratamiento Fúngico pH(TF) presenta un pH inicial de 7,60 y un final de 7,86 dándonos una promedio durante los 77 días que se controló el pH de 7,79.



Gráfica. 4-4: Control de pH
Realizado por: CÁCERES, A. 2015

4.6.3. Carga bacteriana

Se realizó un conteo previo a la inoculación del consorcio bacteriano para conocer la carga bacteriana presente en el sedimento (Ver Tabla. 7-4: Registro inicial de UFC en el Sedimento). Este se realizó mediante placas Petri film AC, cuyo fundamento se realiza en base a la siguiente ecuación $UFC \text{ g sedimento} = N \times FD \times Vt/Vi \times S$, donde:

- **N:** número de colonias
- **FD:** factor de dilución
- **Vt:** Volumen de dilución (10mL)
- **Vi:** Volumen inoculado (mL)
- **S:** cantidad de sedimento utilizado para la siembra (Ver anexo L).

Tabla. 7-4: Registro inicial de UFC en el Sedimento

	Diluciones		
	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
GC	150	85	56
TB	136	73	45

Realizado por: CÁCERES, A. 2015

Posterior a la inoculación del consorcio bacteriano podemos evidenciar el aumento de la carga bacteriana el TB. (Ver Tabla. 8-4: Registro de UFC posterior a la colocación del inóculo en el sedimento)

Tabla. 8-4: Registro de UFC posterior a la colocación del inóculo en el sedimento

	Diluciones		
	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
GC	143	78	49
TB	incontable	incontable	82

Realizado por: CÁCERES, A. 2015

4.6.4. Carga fúngica

Con ayuda de placas petrifilm MR (mohos y levaduras), se determinó la carga fúngica antes de la inoculación, tanto en el grupo control como en el tratamiento con hongos.

Tabla. 9-4: Registro de carga fúngica inicial del sedimento

	Diluciones		
	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
GC	29	15	6
TH	25	17	8

Realizado por: CÁCERES, A. 2015

Posterior a la inoculación del consorcio fúngico podemos evidenciar el aumento de la presencia de hongos en el TH.

Tabla. 10-4: Registro de carga fúngica posterior a la colocación del inóculo en el sedimento

	Diluciones		
	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷
GC	26	16	9
TH	36	25	12

Realizado por: CÁCERES, A. 2015

4.7. Eficacia del proceso de biolixiviación

La eficacia del proceso de biolixiviación se determina mediante una serie de pruebas que nos permitirán comprobar o rechazar la hipótesis planteada, con ayuda del software R-Commander, para el procesamiento de los datos obtenidos.

Tabla. 11-4: Datos ingresados a R-Commander

Nº	Tipo de METAL	Tratamiento	F_BLOQUE	Concentración ANTES	Concentración DESPUES
1	Ba	C	A	291,63	1,316
2	V	C	A	95,91	0,529
3	Cu	C	A	77,97	0,0207
4	Ba	B	A	291,63	3,501
5	V	B	A	95,91	0,0612
6	Cu	B	A	77,97	0,0236
7	Ba	H	A	291,63	1,522
8	V	H	A	95,91	0,0989
9	Cu	H	A	77,97	0,0385

Realizado por: CÁCERES, A. 2015

4.7.1. Influencia de los consorcios bacteriano y fúngico

A fin de evaluar la incidencia de los consorcios se aplica el test de Wilcoxon, para analizar la influencia en la concentración antes y después del experimento.

Hipótesis

H_0 : No existe una influencia de los consorcios bacterianos y fúngicos en la concentración de metales antes y después del experimento.

H_1 : Existe una influencia de los consorcios bacterianos y fúngicos en la concentración de metales antes y después del experimento.

Prueba de Shapiro Wilk

El valor de p 0.0001094 menor al nivel de significancia (0.05), determina el rechazo de H_0 al 95% de confiabilidad, lo que significa que los datos no provienen de una distribución normal.

Prueba de Wilcoxon

Aplicamos el test de Wilcoxon para muestras dependientes en una distribución normal, obteniendo un valor de p igual a 0,003906, aceptando la H_0 al 95% de confiabilidad, es decir, las concentraciones registradas antes y después de la acción bacteriana y fúngica, factor que incide en la eficacia de los consorcios nativos.

4.7.2. Influencia del tipo de metal sobre la concentración del biolixiviado

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

H_1 : Existe una influencia del metal sobre la concentración del biolixiviado

Prueba de Shapiro Wilk

Se obtiene un valor de p igual a 0.0001094 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 Kruskal Wallis

Mediante el análisis para muestras dependientes se obtiene un p valor de 0.05732 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

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

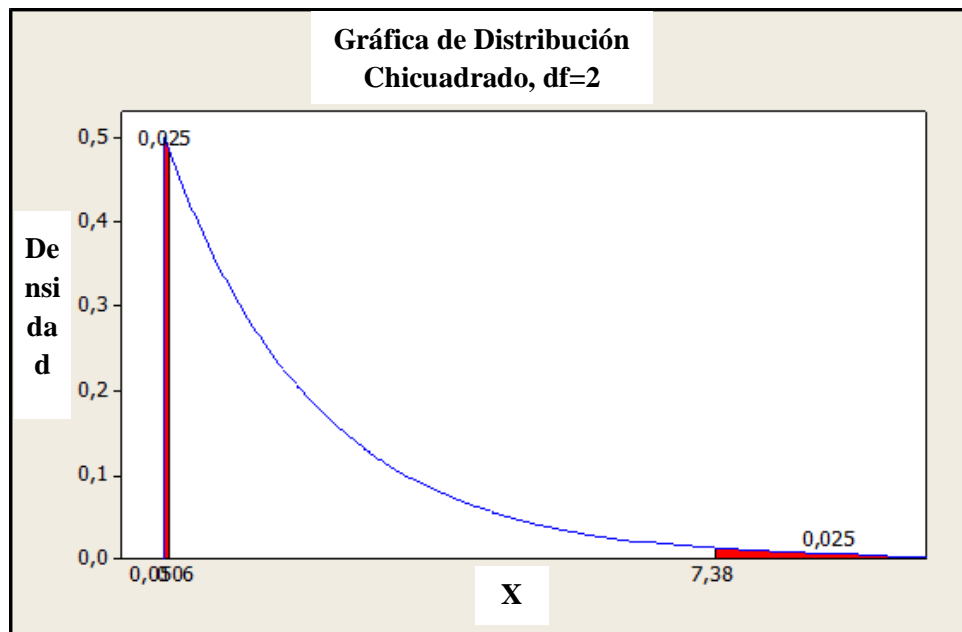
H_1 : Existe una influencia del tratamiento sobre la concentración de metales en el lixiviado

Prueba de Shapiro Wilk

Los datos no provienen de una distribución normal por cuanto el valor de p es igual a 0.0001094

Prueba de Kruskal Walls

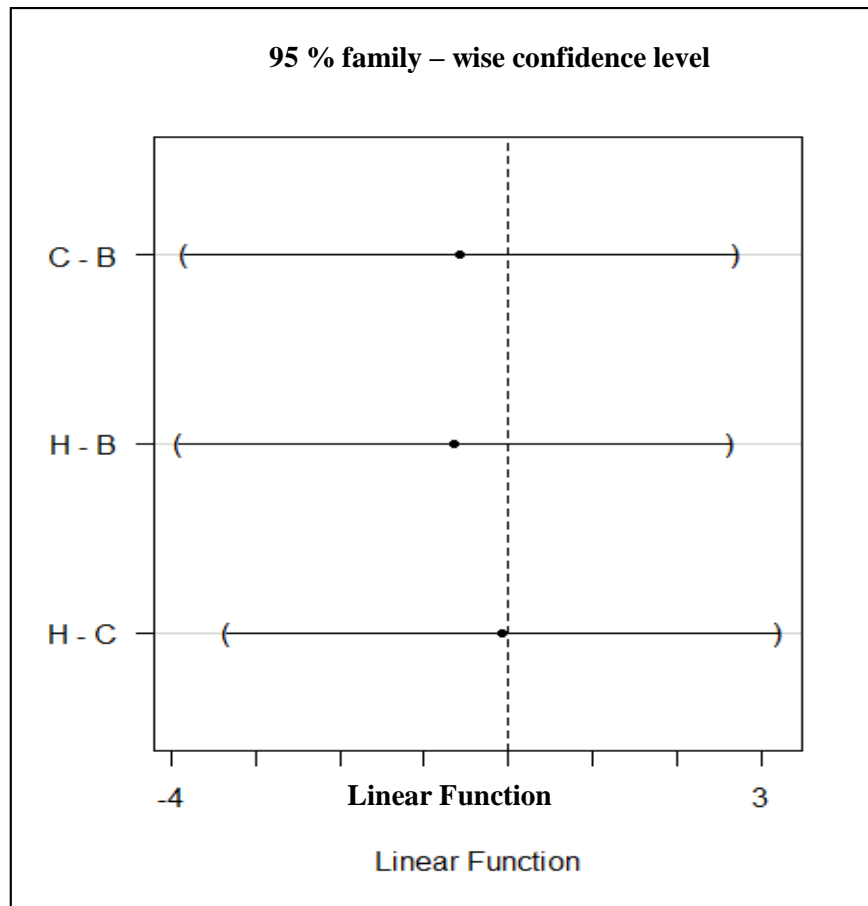
Se obtiene un p valor de 0,9665 aceptando la H_0 al 95% de confiabilidad, determinándose que el tratamiento mediante consorcios bacterianos y fúngicos nativos no influye en la concentración biolixiviada del metal.



Gráfica. 5-4: Gráfica de distribución Chicuadrado

Realizado por: CÁCERES, A. 2015

La prueba del Chi- Cuadrado demuestra la aceptación de H_0 ya que el valor de 5,88 se encuentra dentro de la zona de aceptación, corroborando que los consorcios nativos no influyen en la concentración biolixiviada.



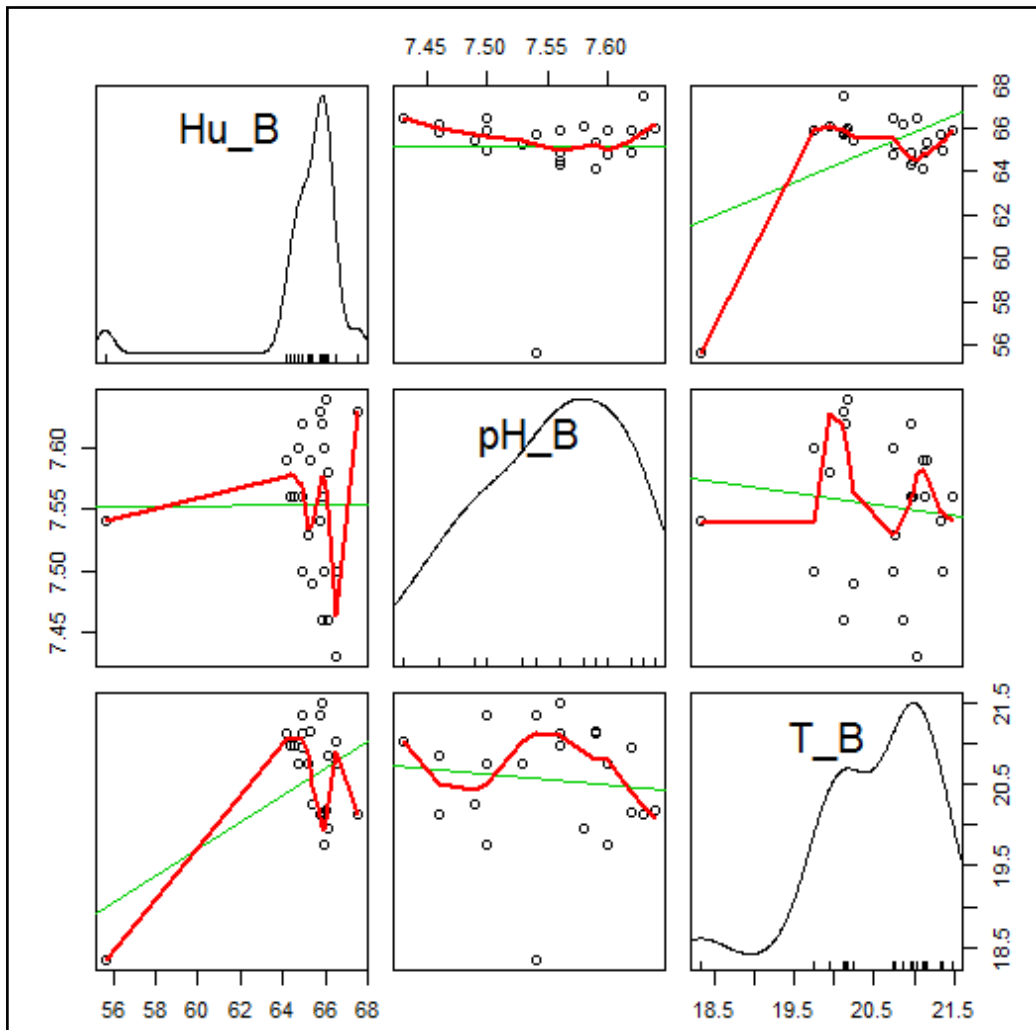
Gráfica. 6-4: Comparación múltiple del tratamiento
Realizado por: CÁCERES, A. 2015

El gráfico de comparación múltiple de los tratamientos demuestran que existe una similitud entre ellos, cada uno de los tratamientos guarda relación con el grupo control ya que sus medias son aproximadas.

4.7.4. *Relación de variables de control*

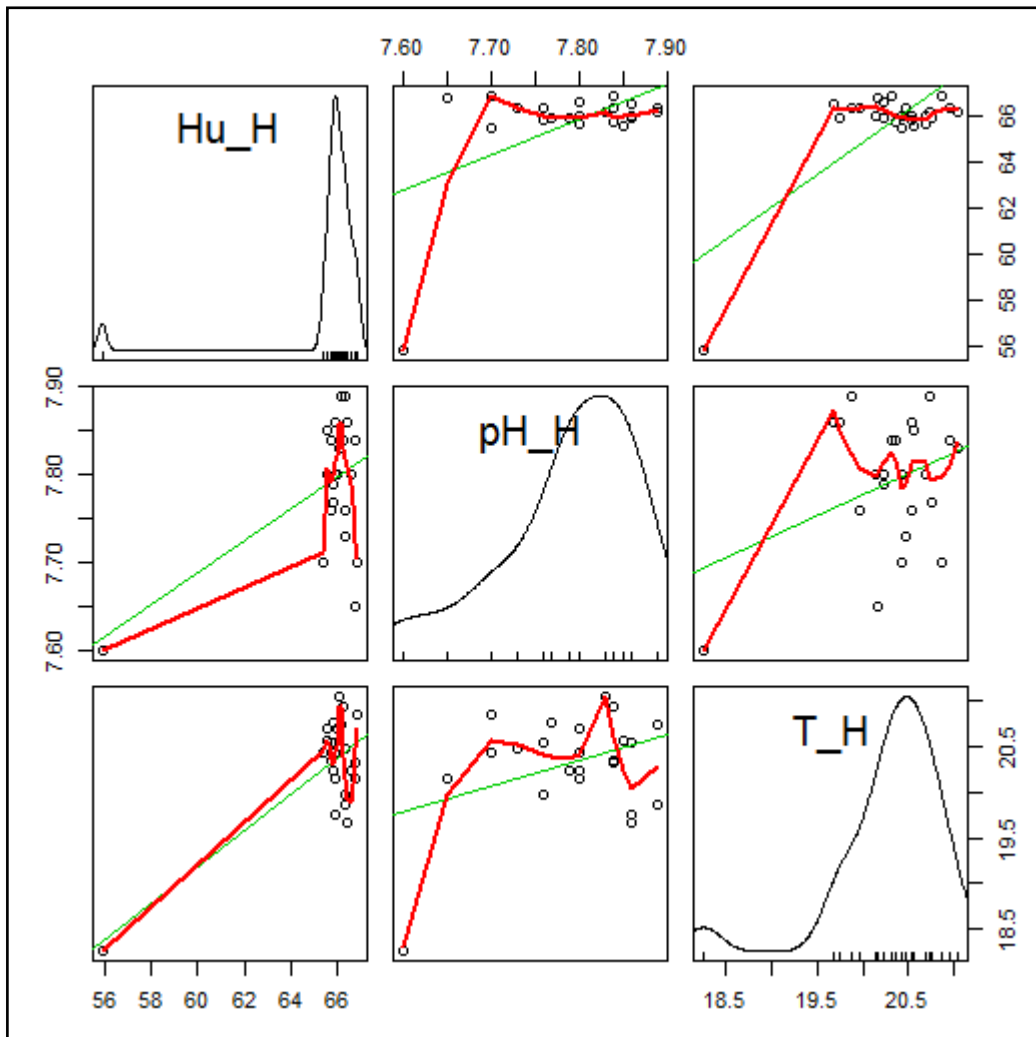
Las variables de control están relacionadas directamente con la actividad de los microorganismos inoculados en el sedimento, de ahí la importancia de controlar dichos parámetros y de relacionarlos entre sí. Cada parámetro está interrelacionado, y depende el uno del otro es así que un aumento en la temperatura podría ocasionar pérdida de humedad y por tanto afectar la actividad microbiana.

En la **Gráfica. 7-4:** Relación de las variables de control en bacterias se muestra el comportamiento de los parámetros de control como pH, Humedad y Temperatura durante el proceso de biolixiviación, así como también interrelacionarlos.



Gráfica. 7-4: Relación de las variables de control en bacterias
Realizado por: CÁCERES, A. 2015

En la **Gráfica. 8-4:** Relación de las variables de control en hongos se observa el comportamiento de los parámetros de control como pH, Humedad y Temperatura durante el proceso de biolixiviación, así como también interrelacionarlos.



Gráfica. 8-4: Relación de las variables de control en hongos
 Realizado por: CÁCERES, A. 2015

CONCLUSIONES

- La caracterización físico-química inicial del sedimento de la laguna de Colta, demostró la presencia de los metales pesados de interés con las siguientes concentraciones para Bario 291,63 mg/kg, para Vanadio 95,91 mg/kg y para Cobre 77,97 mg/kg.
- Se conformaron dos consorcios , uno bacteriano formado por 9 cepas entre las que tenemos *Escherichia coli-inactive* (P5), *Xenorhabdus nematophilys* (P6), *Providencia stuartii*(P10), *Shigella Serogroups A,B y C*(P11), *Xanthomonas maltophilia*(P12), *Morganella morganii biogp 1*(P13), *Escherichia coli-inactive*(P17), *Providencia stuartii* (P18), *Escherichia coli-inactive* (P24),y otro fúngico conformado por 10 cepas entre las que tenemos *Aspergillus*(LC-A), *Aphanoascus*(LC-B), *Penicillium*(LC-C), *Penicillium*(LC-D), *Penicillium*(LC-E), *Asteromyces*(LC-F), *Penicillium* (LC-G), *Gliocladium*(LC-H)., *Lacellinopsis*(LC-I) y *Aspergillus*(LC-J).
- La prueba de biolixiviación en pilas no resulto efectiva, ya que las concentraciones de los metales de interés medidas en el licor de lixiviación son bajas, a pesar de que las variables controladas (pH, humedad, temperatura) se encuentran dentro de los rangos aceptables para el crecimiento de los microorganismos, el método de pilas constituye un método directo y es selectivo para cierto tipo de metales, pero no fue efectivo para Ba, V y Cu.
- El proceso de biolixiviación probado no resultó eficaz para la remoción de metales pesados del sedimento de la Laguna de Colta, ya que los consorcios bacteriano y fúngico no lograron producir ácidos orgánicos para solubilizar el Bario, Vanadio y Cobre, estos resultados son respaldados por los análisis estadísticos realizados, por lo que ninguno de los dos consorcios tiene la capacidad de biolixiviar los metales de interés, a pesar de mantener en el proceso las condiciones óptimas de crecimiento bacteriano y fúngico.

RECOMENDACIONES

- ✓ Esta investigación deja abierto el campo de estudio sobre metales, bacterias y hongos por lo que se propone ahondar los estudios orientados a la transformación de metales pesados mediante la aplicación de consorcios bacterianos y fúngicos nativos, con el objeto de reducir su toxicidad.
- ✓ Realizar la identificación a nivel molecular de las cepas fúngicas y bacterianas con la finalidad de identificar otras aplicaciones que puedan tener estos hongos y bacterias.
- ✓ Ampliar la investigación de la cepa *Aspergillus niger* (LC -J) ya que en bibliografía menciona la su capacidad de producción de ácido cítrico, y su capacidad de biolixiviación probándose sola.
- ✓ Profundizar el estudio de la cepa *Gliocladium virens* (LC-H), y las cepas de *Penicillium* en lo que respecta a la producción de antibióticos,
- ✓ Usar el equipo adecuado de protección personal al momento de manipular microorganismos activados y masificados, para evitar riesgos a la salud.
- ✓ Enfatizar en el uso de consorcios nativos para la descontaminación, ya que estos no alteraran el medio natural.

BIBLIOGRAFÍA

ARCHE, Alfredo. Sedimentología del proceso físico a la cuenca sedimentaria 4.ed. Madrid-España CSIC - CSIC Press 2010 pp. 321-322

BARRIOS, Yaima. Biorremediación: una herramienta para el saneamiento de ecosistemas marinos contaminados con petróleo. *Revista Biotecnología Aplicada.* Vol. 28. Illustrated. La Habana-Cuba. 2011. pp. 61

[http://web.b.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?sid=5c746472-7bb9-4953-ae4f-](http://web.b.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?sid=5c746472-7bb9-4953-ae4f-b11cabb3aad6%40sessionmgr113&vid=1&hid=115)

[b11cabb3aad6%40sessionmgr113&vid=1&hid=115](http://web.b.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?sid=5c746472-7bb9-4953-ae4f-b11cabb3aad6%40sessionmgr113&vid=1&hid=115)

2015-04-14

CASTRO, Gabriel., VALDÉS, Jorge. 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. *Revista Latin American Journal of Aquatic Research.* Vol. 40. Illustrated. Antofagasta-Chile. 2012. pp. 268.

[http://web.a.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=22&sid=83481c79-7c8a-44e3-ba3b-](http://web.a.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=22&sid=83481c79-7c8a-44e3-ba3b-5ec2bfe123e9%40sessionmgr4005&hid=4214)

[5ec2bfe123e9%40sessionmgr4005&hid=4214](http://web.a.ebscohost.com/ehost/pdfviewer/pdfviewer?vid=22&sid=83481c79-7c8a-44e3-ba3b-5ec2bfe123e9%40sessionmgr4005&hid=4214)

2015-03-10

ESPINOSA, Mayra., LUDEÑA, Karina. Lixiviación fúngica de cobre a partir de minerales del distrito minero Portovelo-Zaruma-Minas Nuevas. (TESIS) (Ing. Quím.). Universidad Técnica Particular de Loja. Área Biológica y Biomédica. Loja-Ecuador. 2007 pp. 27.29

JUAREZ, Argelia. 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. Distrito Federal-México. 2004. pp. 9-11

http://digeset.ucol.mx/tesis_posgrado/Pdf/Argelia_Juarez_Alcaraz.PDF

2015-03-06

MIDENCE, Róger., GARCÍA, Josué. Evaluación del potencial de bio-lixiviación fungal autóctona e inoculada de metales en suelos sedimentos contaminados en la región minera de Santo Domingo-Chontales. (TESIS) (Ing. Amb.) Universidad Centroamericana, Facultad de Ciencia, Tecnología y Ambiente, Departamento de desarrollo tecnológico, Managua-Nicaragua.2013 pp. 11-12

http://biorem.univie.ac.at/fileadmin/user_upload/p_biorem/education/research/publications/Theses/Tesis_Midence_y_Garcia_2013.pdf

2015-02-06

SERRANO, Paola. Obtención del consorcio bacteriano nativo del sedimento de la laguna de Colta del cantón Colta. (TESIS) (Ing. Btgia Amb). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Ciencias Químicas, Riobamba-Ecuador. 2014. pp. 39-40

TORTORA, Gerad. Introducción a la microbiología. 9.ed. Buenos Aires-Argentina. Medica Panamericana. 2007. pp 78-79, 85-86, 160- 166.

VOLKE, Tania., et al. Suelos contaminados por metales y metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. 2.ed. Distrito Federal-México. Illustrated. 2005. pp. 90-93

YAGNENTKOVSKY, Nadia. 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, Buenos Aires-Argentina. 2011. pp. 5-6

http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2706/Documento_completo.pdf?sequence=1

2015-02-06

ANEXOS

Anexo A: TOMA DE MUESTRAS DE SEDIMENTOS EN LA LAGUNA DE COLTA



Realizado por: CÁCERES, A. 2015

Anexo B: MUESTRAS DE SEDIMENTOS DE UNIDADES DE CONTROL



Realizado por: CÁCERES, A. 2015

Anexo C: ESTERILIZACIÓN DE MEDIOS MÍNIMOS NUTRITIVOS



Realizado por:CÁCERES, A. 2015

Anexo D: INCUBACIÓN DE MEDIOS CON CEPAS



Realizado por:CÁCERES, A. 2015

Anexo E: SIEMBRA DE MUESTRAS DE SEDIMENTOS PARA OBTENCIÓN DE CEPAS FÚNGICAS



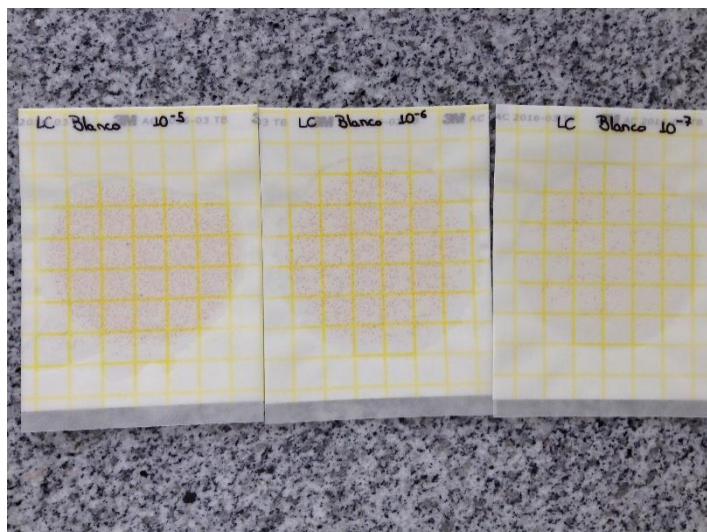
Realizado por: CÁCERES, A. 2015

Anexo F: PURIFICACIÓN DE CEPAS FÚNGICAS



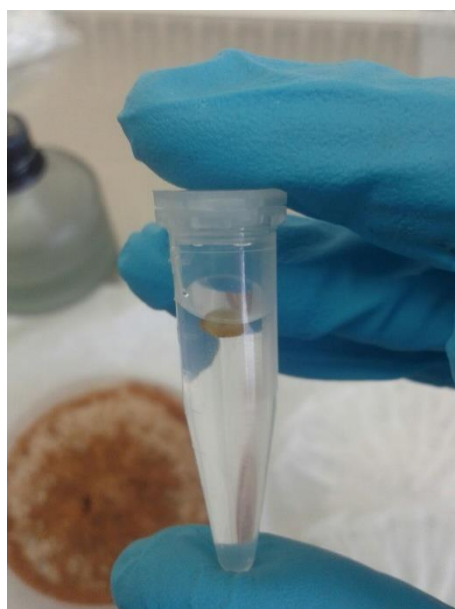
Realizado por: CÁCERES, A. 2015

Anexo G: CONTEO BACTERIANO EN PLACAS PETRIFILM



Realizado por: CÁCERES, A. 2015

Anexo H: CONSERVACIÓN DE CEPAS EN SOLUCIÓN DE GLICEROL



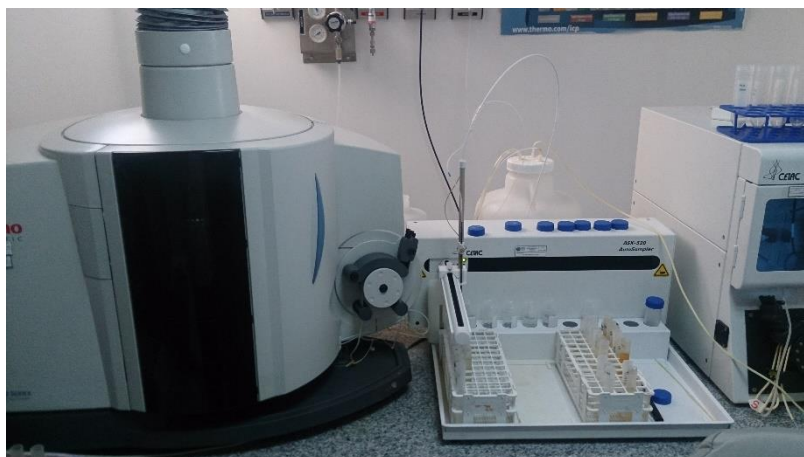
Realizado por: CÁCERES, A. 2015

Anexo I: MUESTRAS DE LIXIVIADOS PARA ANÁLISIS



Realizado por: CACERES, A. 2015

Anexo J: LECTURA DE METALES EN EQUIPO ICP



Realizado por: CACERES, A. 2015

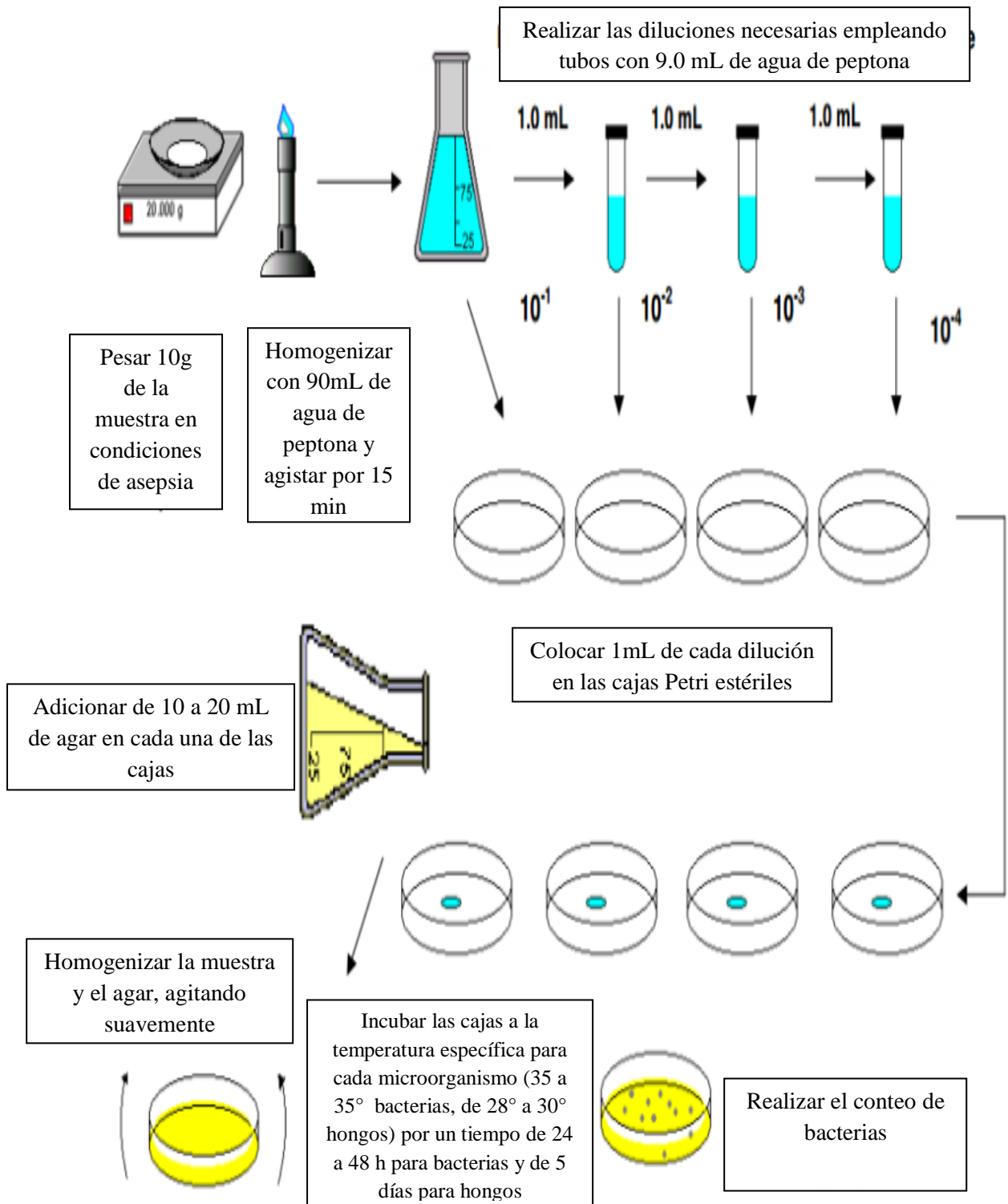
Anexo K: REGISTRO DE TEMPERATURA, pH Y HUMEDAD DURANTE EL PROCESO DE BIOLIXIVIACIÓN

	Fecha	BLANCO			BACTERIAS			HONGOS		
		T	pH	Humedad	T	pH	Humedad	T	pH	Humedad
I inóculo	29/01/2015	18,36	7,23	55,57	18,34	7,54	55,63	18,25	7,60	55,87
	30/01/2015	20,04	7,16	56,20	20,12	7,63	67,53	20,16	7,65	66,76
	02/02/2015	20,56	7,26	56,85	21,03	7,43	66,46	20,86	7,70	66,86
	05/02/2015	20,32	7,28	57,70	20,85	7,46	66,15	20,47	7,73	66,32
	09/02/2015	20,43	7,20	57,35	20,74	7,50	66,46	20,76	7,77	65,87
	12/02/2015	20,57	7,14	57,56	20,15	7,62	65,87	20,43	7,7	65,43
	16/02/2015	20,52	7,21	57,10	19,76	7,60	65,90	19,97	7,76	66,34
	19/02/2015	20,64	7,18	56,50	20,12	7,63	65,73	20,23	7,80	66,57
	23/02/2015	20,43	7,18	56,56	20,17	7,64	66,04	20,32	7,84	66,81
	26/02/2015	20,53	7,23	56,75	19,95	7,58	66,12	19,87	7,89	66,32
	02/03/2015	20,67	7,20	57,67	19,76	7,50	65,94	19,67	7,86	66,46
	05/03/2015	20,43	7,28	57,96	20,13	7,46	65,83	19,75	7,86	65,89
	09/03/2015	20,74	7,15	58,21	20,25	7,49	65,43	20,14	7,80	65,93
	12/03/2015	20,89	7,16	58,36	20,76	7,53	65,23	20,23	7,79	65,85
	16/03/2015	20,75	7,20	57,97	21,13	7,56	64,88	20,54	7,76	65,76
	19/03/2015	20,84	7,24	57,85	21,35	7,50	64,95	20,69	7,80	65,98
	23/03/2015	20,65	7,20	57,93	20,98	7,56	64,52	21,05	7,83	66,12
	26/03/2015	20,45	7,22	58,23	21,12	7,59	64,13	20,95	7,84	66,27
	30/03/2015	20,50	7,17	58,03	20,96	7,56	64,34	20,74	7,89	66,14
	02/04/2015	20,65	7,14	57,92	20,75	7,60	64,76	20,43	7,80	65,95
06/04/2015	20,96	7,17	57,85	20,95	7,62	64,89	20,56	7,85	65,56	
09/04/2015	20,48	7,19	57,95	21,15	7,59	65,32	20,35	7,84	65,70	
13/04/2015	20,56	7,20	58,15	21,34	7,54	65,75	20,69	7,80	65,59	
16/04/2015	20,43	7,16	58,24	21,49	7,56	65,87	20,54	7,86	65,95	

Realizado por: CÁCERES, A. 2015

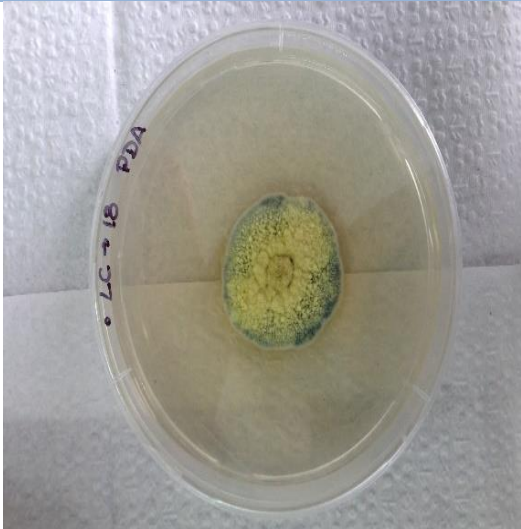

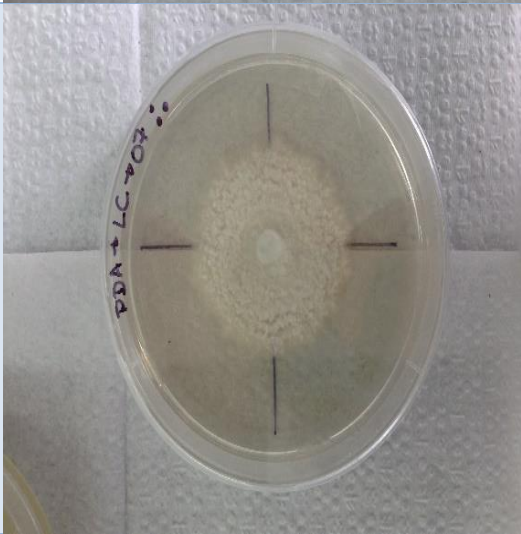
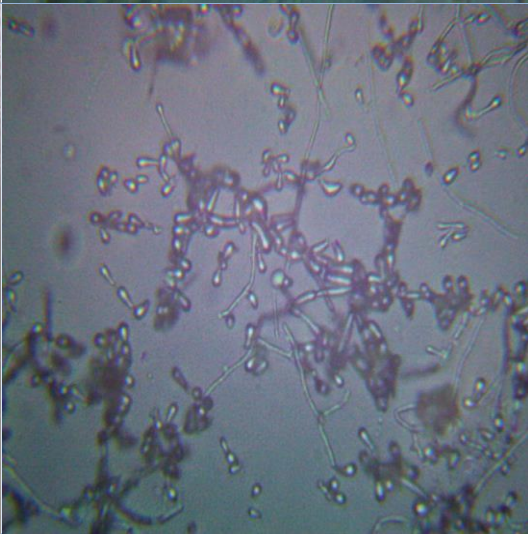

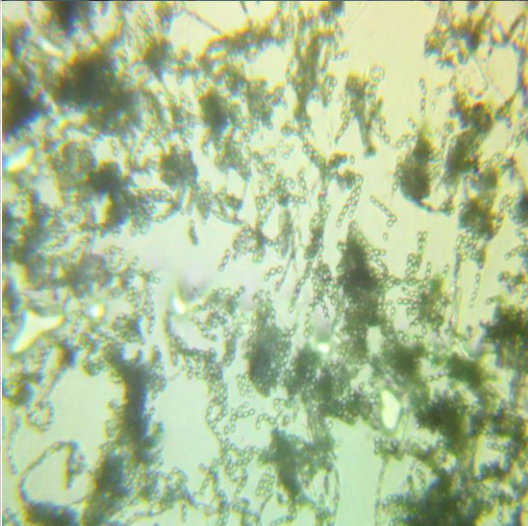
Anexo L: TÉCNICA DE CONTEO EN PLACA DE BACTERIAS

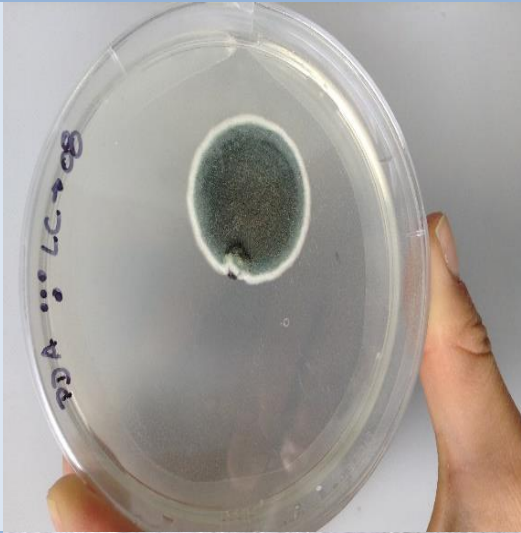
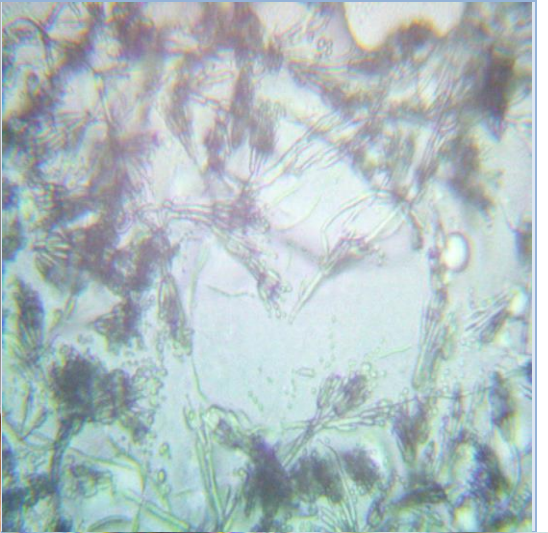

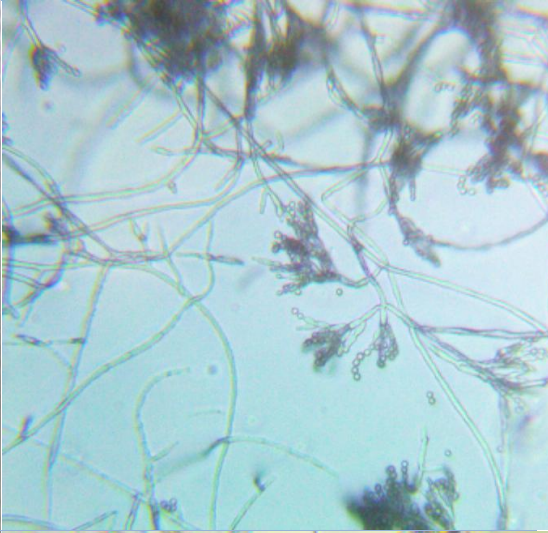

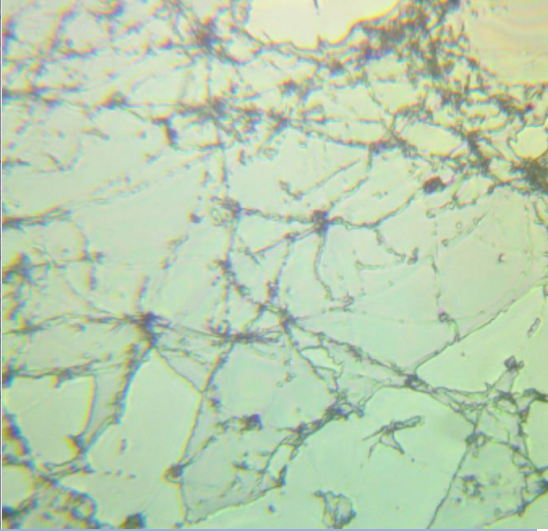
CONTEO EN PLACA DE BACTERIAS


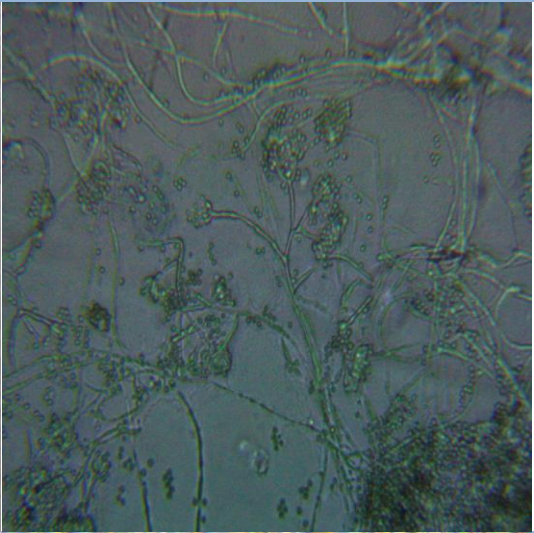

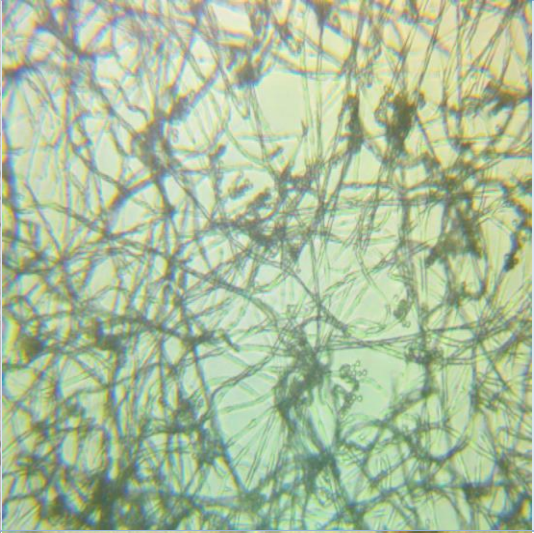

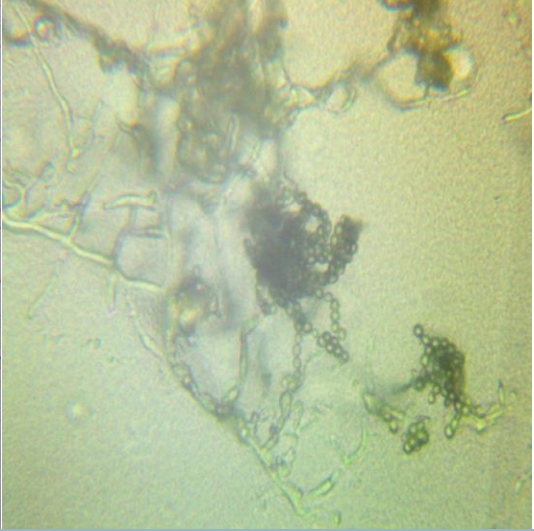


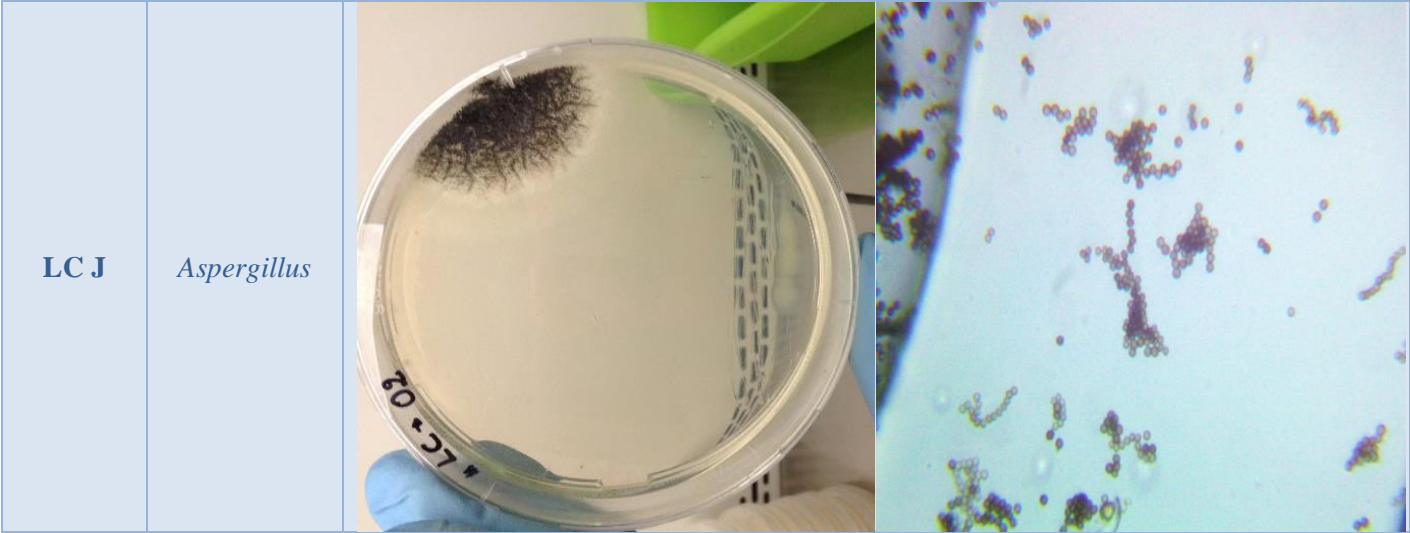
Realizado por: CÁ CERES, A. 2015

Anexo M: RESULTADOS DE LAS CEPAS FÚNGICAS ENCONTRADAS

CEPAS DE HONGOS LAGUNA DE COLTA			
Código	Género	Crecimiento en Caja Petri	Vista al Microscópio
Lc A	<i>Aspergillus</i>		
Lc B	<i>Aphanoascus</i>		
Lc C	<i>Penicillium</i>		


<p>Lc D</p>	<p><i>Penicillium</i></p>		
<p>Lc E</p>	<p><i>Penicillium</i></p>		
<p>Lc F</p>	<p><i>Asteromyces</i></p>		

<p>Lc G</p>	<p><i>Penicillium</i></p>		
<p>Lc H</p>	<p><i>Glucosporium</i></p>		
<p>Lc I</p>	<p><i>Lacellinopsis</i></p>		



Realizado por: CÁ CERES, A. 2015

Anexo N: INFORMES DE RESULTADOS DE LOS SEDIMENTOS

	CENTRO DE SERVICIOS TÉCNICOS Y TRANSFERENCIA TECNOLÓGICA AMBIENTAL	LABORATORIO DE ENSAYO ACREDITADO POR EL OAE
	LABORATORIO DE ANÁLISIS AMBIENTAL E INSPECCIÓN	ACREDITACIÓN Nº OAE LE 2C 06-008

INFORME DE ENSAYO No: 1763
ST: 14- 113 ANÁLISIS DE SUELOS

Nombre Peticionario: NA
Atn. Ing. Marcela 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 09:00
FECHA DE ANÁLISIS: 2014/09/10 - 2014/09/18
TIPO DE MUESTRA: Suelo
CÓDIGO LABCESTTA: LAB-S 341-14
CÓDIGO DE LA EMPRESA: LC-01
PUNTO DE MUESTREO: Laguna de Colta
ANÁLISIS SOLICITADO: Físico- Químico
PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA: Alejandro Flores
CONDICIONES AMBIENTALES: T máx.:25.0 °C. T min.: 15.0 °C


RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETROS	MÉTODO /NORMA	UNIDAD	RESULTADO	INCERTIDUMBRE (k=2)	VALOR LÍMITE PERMISIBLE (■)
Hidrocarburos Totales	PEE/LABCESTTA/26 TNRCC 1005	mg/Kg	315,82	±26%	-
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos	PEE/LABCESTTA/23 EPA SW-846 Method 8310	mg/Kg	0,30	±30%	-
*Bario	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3050B-3051/6010B	mg/Kg	291,63	-	-
*Vanadio	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3050B-3051/6010B	mg/Kg	95,91	-	-
*Cobre	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3050B-3051/6010B	mg/Kg	77,97	-	-
*Nitrógeno Total	PEE/LABCESTTA/88 Kjeldhal	%	0,63	-	-
*Fósforo Total	PEE/LABCESTTA/197 EPA3051a / Espectrofotometría	mg/Kg	988,20	-	-
*Potasio	PEE/LABCESTTA/197 EPA 3051 a / EPA 200.7 ICP	mg/Kg	2314,07	-	-
Potencial de Hidrógeno	PEE/LABCESTTA/24 EPA 8045 D	Unidades de pH	7,08	±0,15	-
*Humedad	PEE/LABCESTTA/80 ASTM D4959	%	82	-	-

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

Página 1 de 2
 Edición 3

Realizado por: CÁCERES, A. 2015
Fuente: LABCESTA

 <p>CESTTA LABCESTA</p> <p>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 Telefax: (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>
--	--	--

OBSERVACIONES:


- Muestra receptada en el laboratorio.
- Los ensayos marcados con (*) no están incluidos en el alcance de la acreditación del SAE.

RESPONSABLE:

Dr. Mauricio Álvarez
RESPONSABLE TÉCNICO

Realizado por: CÁCERES, A. 2015
Fuente: LABCESTA

Anexo Ñ: INFORMES DE RESULTADOS DE LOS LIXIVIADOS

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

INFORME DE ENSAYO No. ST:	748 15 – 009 ANÁLISIS DE LIXIVIADOS
Nombre Peticionario:	NA
Atn.	Ing. Marcela 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 ANÁLISIS:	2015/04/28 - 2015/05/07
TIPO DE MUESTRA:	Lixiviado
CÓDIGO LABCESTA:	LAB-L 016-15
CÓDIGO DE LA EMPRESA:	LC-B
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/LABCESTA/174 EPA245.7/EPA 3015 ^a	µg/l	52,90	-
Bario	PEE/LABCESTA/174 EPA245.7/EPA 3015 ^a	µg/l	131,60	-
Cobre	EPA 1311 / 200.7 ICP	µg/l	2,07	-

OBSERVACIONES:

- Muestra receptada en el laboratorio.

RESPONSABLE DEL INFORME:

Dr. Mauricio Álvarez
RESPONSABLE TÉCNICO

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

MC01-16

Realizado por: CÁCERES, A. 2015

Fuente: LABCESTA

Página 1 de 1
Edición 3



**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
Telefax: (03) 3013183**

**INFORME DE ENSAYO No.
ST:**

748
15 – 009 ANÁLISIS DE LIXIVIADOS

**Nombre Peticionario:
Atm.
Dirección:**

NA
Ing. Marcela 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 ANÁLISIS:
TIPO DE MUESTRA:
CÓDIGO LABCESTTA:
CÓDIGO DE LA EMPRESA:
PUNTO DE MUESTREO:
ANÁLISIS 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 015-15
LC-BA
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 ^a	µg/l	6,12	-
Bario	PEE/LABCESTTA/174 EPA245.7/EPA 3015 ^a	µg/l	350,10	-
Cobre	EPA 1311 / 200.7 ICP	µg/l	2,36	-

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
Telefax: (03) 3013183

**INFORME DE ENSAYO No.
ST:**

748
15 – 009 ANÁLISIS DE LIXIVIADOS

**Nombre Peticionario:
Atn.
Dirección:**

NA
Ing. Marcela 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 ANÁLISIS:
TIPO DE MUESTRA:
CÓDIGO LABCESTTA:
CÓDIGO DE LA EMPRESA:
PUNTO DE MUESTREO:
ANÁLISIS 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 014-15
LC-H
Laboratorio de Biotecnología de facultad de Ciencias
Físico – Químico
Alejandro Flores
T máx.:25.0 °C. T min.: 15.0°C

RESULTADOS ANALÍTICOS:

PARÁMETROS	MÉTODO/NORMA	UNIDAD	RESULTADO	VALOR LÍMITE PERMISIBLE (■)
Vanadio	PEE/LABCESTTA/174 EPA245.7/EPA 3015 ^a	µg/l	9,89	-
Bario	PEE/LABCESTTA/174 EPA245.7/EPA 3015 ^a	µg/l	152,20	-
Cobre	EPA 1311 / 200.7 ICP	µg/l	3,85	-

OBSERVACIONES:

- Muestra receptada en el laboratorio.

RESPONSABLE DEL INFORME:

**Dr. Mauricio Álvarez
RESPONSABLE TÉCNICO**