



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

**“EVALUACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE ARSÉNICO CON
CEPAS BACTERIANAS AISLADAS DE RELAVES MINEROS, EN EL
CANTÓN PONCE ENRÍQUEZ”**

Trabajo de titulación para optar por el título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORA: ANABELL DUQUE SARANGO

TUTORA: DRA. YOLANDA DÍAZ

RIOBAMBA-ECUADOR

Febrero – 2016

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA CIENCIAS QUÍMICAS

El Tribunal de Trabajo de titulación certifica que: El trabajo: “EVALUACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE ARSÉNICO CON CEPAS BACTERIANAS AISLADAS DE RELAVES MINEROS, EN EL CANTÓN PONCE ENRÍQUEZ”, de responsabilidad de la señorita Anabell Duque Sarango, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal de Trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

**DIRECTORA DE TRABAJO
DE TITULACIÓN**

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Anabell Duque Sarango, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

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

Riobamba, 21 de Enero del 2016

Anabell Duque Sarango

Cédula de identidad 1105210551

Yo, Anabell Duque Sarango soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de titulación y el patrimonio intelectual del Trabajo de titulación pertenece a la Escuela Superior Politécnica De Chimborazo

ANABELL DUQUE SARANGO

AGRADECIMIENTO

Agradezco infinitamente a mis padres y hermanas por su apoyo incondicional en mi vida y por sus consejos a lo largo de mi proceso formativo. Los amo.

A la compañía minera MINEREICIS, socios, directivos, ejecutivos y técnicos, por apoyarme, confiar en mí y hacer posible esta investigación.

A la Dra. Yolanda Díaz, directora de tesis y al PhD. Gerardo Medina, asesor de tesis, por su guía y continuo asesoramiento.

A la Dra. Aida Fierro, Dra. Isabel Ortiz y Dra. Patricia Layedra, por su ayuda desinteresada y su permanente apoyo a los tesisistas.

Finalmente agradezco a todas las personas, amigos, compañeros, que directa o indirectamente ayudaron a culminar exitosamente este proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	XIII
SUMMARY	XIV
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	5
1.1. Antecedentes de la investigación.....	5
1.2. La minería en Ecuador.....	5
1.3. Descripción del área de influencia.....	6
1.4. Descripción de la compañía minera MINEREICIS S.A.....	7
1.5. Minería	8
1.6. Efectos de la actividad minera.....	8
1.7. Relaves Mineros	9
1.7.1. Composición de los relaves mineros	10
1.8. Tratamiento de relaves mineros.....	19
1.9. Biorremediación	20
1.9.1. Tipos de Biorremediación	20
1.9.2. Bacterias	20
1.9.3. Aislamiento de bacterias.....	21
1.10. Arsénico.....	21
1.11. Arsenito de sodio.....	24
1.12. Arsenato de sodio	26
1.13. El Arsénico en el ambiente.....	28

1.14.	Descontaminación de Arsénico	29
1.14.1.	Filtración.....	29
1.14.2.	Adsorción	30
1.14.3.	Coagulación	30
1.14.4.	Oxidación	31
1.14.5.	Intercambio iónico.....	31
1.14.6.	Ósmosis inversa.....	32
1.14.7.	Tratamientos biológicos	32
1.14.8.	Biorremediación de arsénico	33
1.1.	Normativa Legal.....	36
1.1.1.	Plan Nacional del Buen Vivir.....	36
1.1.2.	Ley de Minería	38
1.1.3.	Límites de Descarga a un cuerpo de agua dulce.....	41

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO	43
2.1.	Metodología de la investigación.....	43
2.2.	Diseño de la investigación.....	43
2.3.	Etapas de la investigación.....	43
2.3.1.	Primera etapa: Caracterización de relaves mineros de MINEREICIS S.A	44
2.3.2.	Segunda etapa: Aislamiento de cepas bacterianas.....	44
2.3.3.	Tercera etapa: Evaluación de resistencia a altas concentraciones de arsénico.	47
2.3.4.	Cuarta etapa: Prueba de oxidación/ reducción de arsénico.....	47
2.3.5.	Quinta etapa: Identificación de las cepas bacterianas aisladas de relaves mineros	49

CAPÍTULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.	50
3.1.	Muestreo	50
3.2.	Primera etapa: Caracterización de relaves mineros de MINEREICIS S.A.	51
3.3.	Segunda etapa: Aislamiento de cepas bacterianas.....	52
3.4.	Tercera etapa: Evaluación de resistencia a altas concentraciones de arsénico.	58
3.5.	Cuarta Etapa: Pruebas de oxidación / reducción de arsénico	67
3.5.	Quinta Etapa: Identificación de las cepas bacterianas aisladas de relaves mineros	70
	CONCLUSIONES	72
	RECOMENDACIONES	73
	BIBLIOGRAFÍA	74
	ANEXOS	81
	Anexo 1: Caracterización de los relaves mineros	81
	Anexo 2: Absorbancia de las cepas aisladas	83
	Anexo 3: Pruebas bioquímicas.....	84
	Anexo 4: Temperaturas de la ciudad de Riobamba.....	7385

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1-1.	Ubicación de la Compañía Minera MINEREICIS S.A.	7
Figura 2-1.	Efectos causados por la exposición a Arsénico en pies.....	23
Figura 3-1.	Efectos causados por la exposición a Arsénico en manos.....	23
Figura 4-1.	Ciclo del Arsénico en el ambiente.....	28
Figura 5-1.	Modelo de la enzima arsenito oxidasa.....	34
Figura 6-3.	Piscina de relaves mineros	50
Figura 7-3.	Piscina de tratamiento de relaves mineros (Laguna).....	5134
Figura 8-3.	Crecimiento bacteriano en distintos medios a temperatura ambiente	53
Figura 9-3.	Crecimiento bacteriano en distintos medios a 30°C.....	54
Figura 10-3.	Crecimiento bacteriano en distintos medios a 35°C.....	55
Figura 11-3.	Comparación de crecimiento bacteriano en distintos medios	56
Figura 12-3.	Crecimiento de bacterias de la muestra M2 en diferentes medios a 30°C.....	57
Figura 13-3.	Apariencia de los clones estabilizados en OGYE + NaAsO ₂ 1mM después de 24h de incubación a temperatura ambiente.....	58
Figura 14-3.	Cepas resistentes a concentraciones de 5mM de arsenito y 5mM de arsenato.....	59
Figura 15-3.	Cepas resistentes a concentraciones de 10mM de arsenito y 10mM de arsenato.....	60
Figura 16-3.	Cepas resistentes a concentraciones de 15mM de arsenito y 15mM de arsenato.....	61
Figura 17-3.	Cepas resistentes a concentraciones de 20mM de arsenito y 20mM de arsenato.....	62
Figura 18-3.	Cepas resistentes a concentraciones de 30mM de arsenito y 30mM de arsenato.....	63
Figura 19-3.	Tubos de control de pruebas de oxidación /reducción de arsénico	67
Figura 20-3.	Prueba de oxidación/reducción de arsénico. Arsenato 5mM.	68
Figura 21-3.	Prueba de oxidación/reducción de arsénico. Arsenito 5mM.	68
Figura 22-3.	Prueba de oxidación/reducción de arsénico. Arsenato y Arsenito 5mM.....	69

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1.	Límites de descarga a un cuerpo de agua dulce.....	42
Tabla 2-3.	Metales totales en relaves mineros.	5142
Tabla 3-3.	Crecimiento bacteriano en distintos medios a temperatura ambiente.....	5342
Tabla 4-3.	Crecimiento bacteriano en distintos medios a 30°C	54
Tabla 5-3.	Crecimiento bacteriano en distintos medios a 35°C.	55
Tabla 6-3.	Pruebas de Resistencia a arsénico. Cepas aisladas a temperatura ambiente.....	64
Tabla 7-3.	Pruebas de Resistencia a arsénico. Cepas aisladas a 30°C.	65
Tabla 8-3.	Identificación de las cepas bacterianas aisladas de relaves mineros.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS

AsO₃⁴⁻	Arsenato
AsO₃³⁻	Arsenito
AgNO₃	Nitrato de plata
ACGIH	American Conference of Gubernamental Industrial Hygienists. Estados Unidos. (Conferencia Estadounidense de Higienistas Industriales Gubernamentales)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
As	Arsénico
DL50	Dosis letal media
DLm	Dosis letal mínima
DTm	Dosis tóxica mínima
EPA	Environmental Protection Agency. Estados Unidos. (Agencia de Protección Ambiental)
HCl	Ácido clorhídrico
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
kg	Kilogramo
L	Litro
M	Molar
M1	Muestra líquida de la laguna
M2	Muestra líquida de relaves
M3	Muestra sólida de relaves
m³	Metro cúbico
mg	Miligramo
MID	Microgen identificación
MINEREICIS S.A.	Minera Reina del Cisne Sociedad Anónima
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanogramo
NFPA	National Fire Protection Association. Estados Unidos. (Asociación

	Nacional para la Protección contra Incendios)
NIOSH	National Institute for Occupational Safety and Health. Estados Unidos. (Instituto Nacional para la Salud y Seguridad en el Trabajo)
OGYE	Oxytetracycline glucose yeast extract
OSHA	Occupational Safety and Health Administration. Estados Unidos. (Administración de Salud y Seguridad en el Trabajo)
rpm	Revoluciones por minuto
SOMILOR S.A.	Sociedad Minera Liga de Oro Sociedad Anónima
TULSMA	Texto Unificado de Legislación Secundaria, Medio Ambiente.
UFC	Unidades formadoras de colonia
µg	Microgramo
µL	Microlitro

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la degradación de arsénico con cepas bacterianas aisladas de relaves mineros del cantón Ponce Enríquez de la provincia de Azuay. A partir de las muestras de relaves, se aisló 47 cepas bacterianas que fueron sometidas a pruebas de resistencia a arsénico, para lo cual se usó como medio de cultivo OGYE Agar Bacto adicionando arsenito y arsenato a diferentes concentraciones. La capacidad de oxidación o reducción de arsénico fue evaluada mediante pruebas cualitativas con nitrato de plata. La caracterización se realizó mediante el sistema de pruebas bioquímicas MICROGEN MID 64 y MID 65. Se obtuvo 8 cepas que resistieron concentraciones de 30mM de arsenito y arsenato, las cuales se identificaron como bacilos Gram negativos de los géneros *Pseudomona*, *Vibrio* y *Pasteurella*. El 100% de las bacterias identificadas fueron capaces de reducir el arsenato a arsenito en un periodo de 5 días. Se concluyó que las bacterias aisladas son extremotolerantes debido a su crecimiento en un medio con altos niveles de arsénico, que además pueden reducirlo como un mecanismo de detoxificación. Se recomienda continuar con identificación de bacterias resistentes a arsénico para comprender su función en el ambiente y sus posibles aplicaciones en tratamientos biotecnológicos.

Palabras clave: <DEGRADACIÓN DE ARSÉNICO>, <RELAVES MINEROS>, <AISLAMIENTO DE BACTERIAS>, <ARSENITO>, <ARSENATO>, <EXTREMÓFILAS>, <*Pseudomona*>, <*Vibrio*>, <*Pasteurella*>, <TRATAMIENTOS BIOTECNOLÓGICOS>.

SUMMARY

The aim of this study was to assess degradation of arsenic with bacterial strains isolates from mine tailings at Ponce Enriquez Canton in Azuay province. From tailings samples 47 bacterial strains were isolated and tested for resistance arsenic, for which it was used as culture medium Oxytetracycline Glucose Yeast Extract (OGYE) agar Bacto adding arsenic and arsenate in different concentrations. Oxidation capacity or reduction of arsenic was assessed by qualitative test with silver nitrate. The description was performed using biochemical test system with 64 and 65 Microgen identification (MID). It was obtained 8 strains that resisted 30mM of arsenic and arsenate concentrations, these were identified as a gram negative bacillus from *Pseudomonas*, *Pasteurella* and *Vibrio*. The 100% of bacteria were able to reduce arsenate to arsenite in a period of 5 days. It concluded that isolated bacteria are extremotolerant due to its growth on a medium containing high levels of arsenic, which can also reduce as a detoxification process. It is recommended to continue identifying arsenic resistant bacteria in order to understand their role in the environment and its possible applications in biotechnology treatments.

Key words: <DEGRADATION OF ARSENIC>, <MINE TAILINGS>, <ISOLATION OF BACTERIA>, <ARSENITE>, <ARSENATE>, <EXTREMOTOLERANT>, <*Pseudomonas*>, <*Pasteurella*>, <*Vibrio*>, <BIOTECHNOLOGY TREATMENTS>.

INTRODUCCIÓN

La minería es una actividad que ha causado impactos negativos a nivel global, debido a las emisiones contaminantes que alteran ecosistemas terrestres, acuáticos, aéreos, y producen afectaciones en la salud humana. En Ecuador se han llevado a cabo actividades de minería artesanal desde épocas preincaicas, colonos españoles y empresas extranjeras encontraron una alta rentabilidad en la explotación de los minerales de los suelos del país, desde entonces los ecuatorianos iniciaron también la explotación a gran escala estos recursos (Cámara de minería del Ecuador, 2013, <http://www.cme.org.ec/>).

Actualmente en Ecuador la minería se ha tecnificado pero aún existe una alta presencia de mineros informales. En la minería a gran escala como en la artesanal persisten problemas sociales, legales y ambientales. La emisión de efluentes con altas concentraciones de metales pesados es uno de los principales problemas. Los metales pesados y otros contaminantes han alterado ecosistemas terrestres y acuáticos, además, afectan directa o indirectamente a las poblaciones cercanas a las zonas mineras (Fundación Ecológica Arcoíris, 2006, p. 28).

El cantón Ponce Enríquez de la provincia de Azuay cuenta con un alto número de compañías mineras nacionales que operan permanentemente en la extracción de oro y plata. A lo largo del tiempo se ha evidenciado el deterioro de la calidad del agua en ríos y quebradas del sector, debido a los vertidos de minería que contienen sedimentos, mercurio, metales pesados, sólidos disueltos, aguas ácidas, aceites, lubricantes, y aguas servidas (Durán, 2008, p. 3).

La minería conlleva el uso de reactivos químicos que pueden causar alteraciones de aguas superficiales y subterráneas. Además, los contaminantes pueden ser transportados por el agua y contaminar otros medios. De ahí radica la importancia de tratar las aguas residuales mineras y devolver al ambiente un agua libre de compuestos químicos tóxicos y peligros (Fundación Ecológica Arcoíris, 2006, p. 13).

El arsénico puede llegar al agua mediante procesos naturales asociados a la composición geológica del suelo, pero actualmente las actividades antropogénicas como la minería, el curtido de pieles, el uso de pesticidas y plaguicidas que contienen arsénico, han incrementado la contaminación de fuentes hídricas. A nivel mundial se usa grandes cantidades de arsénico para el tratamiento de madera, en menor cantidad se usa para productos químicos agrícolas, y otro pequeño porcentaje es usado en la fabricación de vidrios, uso farmacéutico y aleaciones no ferrosas (Ahumada, 2014, p. 34).

El arsénico puede presentarse en su forma orgánica o inorgánica, ambas son tóxicas, pero la inorgánica es la más perjudicial. Este metaloide puede ser liberado a la atmósfera debido a procesos tales como: erupciones volcánicas, quema de vegetación y combustión de carbón. La acción volcánica es una de las principales fuentes, en este proceso el metal es liberado en forma de trióxido de arsénico, las partículas son dispersadas en el ambiente y luego se depositan nuevamente en la tierra (Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades, 2014, <http://www.atsdr.cdc.gov>).

En el aire la concentración de arsénico varía entre 1 y 10 ng/m³ en áreas rurales y puede alcanzar valores de 20 ng/m³ en áreas urbanas. En suelo no contaminado la concentración de arsénico es usualmente menor a 20 mg/kg de suelo. Mientras que en agua no contaminada puede presentarse en concentraciones entre 1 y 10 µg/L (Carabantes y Fernicola, 2003, pp. 365).

La principal vía de exposición para los seres humanos es a través del agua y alimentos contaminados. Los mariscos se caracterizan por contener arsénico orgánico, el cual, en pocas cantidades no afecta al organismo. Mientras que el inorgánico puede ser consumido directamente en agua contaminada, alimentos preparados con agua contaminada o cultivos regados con esta agua. (Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades, 2014, <http://www.atsdr.cdc.gov>).

Las afectaciones debido a la exposición a arsénico varían de acuerdo a la población y la zona geográfica, por lo tanto no se tiene una definición fija de sus efectos, pero en general se puede considerar que el consumo de agua o alimentos contaminados con arsénico producen en los seres

humanas alteraciones en la piel como cambios de pigmentación, lesiones y callosidades en manos y pies (Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades, 2014, <http://www.atsdr.cdc.gov>).

Cuando la exposición es prolongada, aproximadamente cinco años o más, el arsénico puede ser precursor de cáncer de piel, cáncer de vejiga y cáncer de pulmón. Además puede provocar deficiencias en el desarrollo, enfermedades cardiovasculares, neurotoxicidad y diabetes. En casos de intoxicación aguda, se pueden presentar síntomas de vómitos, dolor abdominal, diarrea, entumecimiento u hormigueo en manos y pies, calambres musculares, y en casos extremos, la muerte (Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades, 2014, <http://www.atsdr.cdc.gov>).

Actualmente la contaminación de agua por arsénico es un problema de salud pública. En algunos países como Argentina, India, Taiwán y Vietnam las altas concentraciones de arsénico en el agua se deben a la presencia natural del metal en el ambiente. Y en países como Chile, México y China la contaminación es causada por actividades antropogénicas como la minería y la quema de carbón (Ahumada, 2014, p. 35).

En 1958 la Organización Mundial de la Salud indicó un límite máximo permisible de arsénico en el agua potable de 200 µg/L. En 1963, la concentración máxima se redujo a 50 µg/L. Posteriormente, tras estudios realizados acerca de la toxicidad del metal, la OMS pasó a considerar al arsénico como una de las 10 sustancias químicas más preocupantes para la salud pública y recomendó una concentración máxima de 100 µg/L en el agua cruda para potabilizar y 10 µg/L en el agua potable, este valor ha sido adoptado en Estados Unidos y Europa. Mientras que en países como Bahrein, Bangladesh, Bolivia, China, Egipto, India, Indonesia, Omán, Filipinas, Arabia Saudita, Sri Lanka, Vietnam y Zimbabwe, se mantiene el límite anterior de 50 µg/L para el agua potable (Ahumada, 2014, p. 36).

En Ecuador de acuerdo a la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1108, el límite máximo permisible para el agua potable es de 10 µg/L, que concuerda con lo recomendado por la OMS (INEN, 2014, p. 2).

Dentro de la presente investigación se evaluó la actividad bacteriana en medios de cultivos con concentraciones variables de arsénico. El estudio de la biotransformación de arsénico es importante debido a que este metal se encuentra de forma natural en el ambiente, de igual forma es necesario conocer y tratar el arsénico presente en fuentes hídricas, ya que es la forma más común para entrar en contacto con seres vivos.

Se analizó un método de biorremediación utilizando bacterias nativas, el cuál, en comparación con técnicas físicas y químicas, produce iguales o mejores resultados para el tratamiento de medios contaminados o alterados. La biorremediación presenta grandes beneficios ambientales y económicos; es fácil de implementar, generalmente requiere menos equipos y mantenimiento, además, no produce subproductos peligrosos. (Castillo R., 2005, p. 32).

La importancia de esta investigación está reflejada en el estudio de un método biotecnológico para tratar arsénico, un metal pesado que se encuentra en altas concentraciones en los efluentes líquidos mineros, lo que permitirá dar solución a un problema relevante del país.

El presente estudio aspira ser un aporte teórico y práctico para futuros proyectos de investigación, que incluyan la aplicación y evaluación de las bacterias aisladas en tratamientos de efluentes líquidos industriales, así como el análisis de nuevas técnicas de biorremediación.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Antecedentes de la investigación

En el informe del Monitoreo ambiental de las áreas mineras en el sur del Ecuador, 1996 -1998 PRODEMINCA (Proyecto de Desarrollo Minero y Control Ambiental) -Banco Mundial se establece que la explotación de oro en el sur del Ecuador ha causado considerables impactos ambientales siendo los más severos los de las áreas Portovelo, Zaruma, y Camilo Ponce Enríquez (Durán, 2008, p. 3).

Los contaminantes más importantes son los metales pesados y el cianuro, y las principales fuentes contaminantes son los efluentes líquidos descargados directa o indirectamente en los ríos. Estas descargas han provocado la extinción de toda forma de vida superior en ciertos tramos de ríos y han alterado considerablemente el agua, lo que imposibilita su uso como agua potable, para irrigación o criaderos acuáticos (Durán, 2008, p. 4).

1.2. La minería en Ecuador

Ecuador ha mantenido una explotación minera desde épocas preincaicas. La actividad minera se intensificó con la colonización. Es así que en 1904 se constituyó la South American Development

Company (SADCO), compañía norteamericana que ejecutó la prospección, la exploración, el desarrollo y la producción de la mina de Portovelo, hasta 1950. Su producción estimada de oro fue de 3'500.000 onzas (Cámara de minería del Ecuador, 2015, <http://www.cme.org.ec/>). Desde entonces se han implantado en Ecuador compañías nacionales e internacionales dedicadas a esta actividad.

1.3. Descripción del área de influencia

El cantón Camilo Ponce Enríquez fue creado el 28 de Marzo del 2002, pertenece a la provincia de Azuay y limita al Norte con los cantones Naranjal y Cuenca, al Sur con la parroquia Tendales de la Provincia de El Oro, al Este con los cantones Cuenca, Santa Isabel y Pucará; y, al Oeste con las parroquias de Tenguel y Balao. Su clima es tropical húmedo. El cantón cuenta con una población de 21,998 habitantes, 12.211 hombres y 9.787 mujeres (Instituto Nacional de Estadística y Censos, 2010, <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/>).

En cuanto a educación, el cantón cuenta con 32 escuelas unidocentes, 17 escuelas pluridocentes, 6 escuelas completas, 8 extensiones de la Unidad Educativa a Distancia del Azuay, 3 Colegios Nacionales, 2 Unidades Educativas Particulares, 1 Centro de Formación Artesanal, 1 Colegio Semi-Preencial (Instituto Nacional de Estadística y Censos, 2010, <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/>).

Respecto a salud, cuenta con un centro de salud y 5 sub-centros ubicados estratégicamente en las comunidades: Bella Rica, Shumiral, Río Balo, Luz y Guía y en la Parroquia Carmen de Pujilí (Instituto Nacional de Estadística y Censos, 2010, <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/>).

La agricultura es una de las principales actividades económicas, pero el cantón destaca a nivel nacional por mantener un alto índice de extracción minera (Instituto Nacional de Estadística y Censos, 2010, <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/>).

1.4. Descripción de la compañía minera MINEREICIS S.A

MINEREICIS S.A. es una empresa privada dedicada a la exploración, explotación, beneficio, fundición, refinación y comercialización de oro, cuyos procesos se realizan con absoluta responsabilidad ambiental, para lo cual ha establecido un plan de manejo ambiental con los respectivos programas. Dispone de un equipo humano experto y especializado, formado en las disciplinas humanísticas, sociales, ambientales, de la minería y la geología. Además la empresa busca una mejora continua mediante la implementación y actualización de las técnicas de extracción de minerales y tratamiento de aguas residuales (Compañía Minera Reina del Cisne, 2010, p. 2). Actualmente la Compañía cuenta con más de 320 trabajadores, brindándoles así un empleo y salario digno.

Ubicación de la empresa:

- Sector: La López Alto
- Parroquia: Camilo Ponce Enríquez
- Cantón: Camilo Ponce Enríquez
- Provincia: Azuay
- Extensión: 90 hectáreas
- Coordenadas Latitud: 64223; Longitud: 965855



Figura 1-1 Ubicación de la Compañía Minera MINEREICIS S.A.

Fuente: Google Earth, 2015

1.5. Minería

La minería es la actividad de extracción de minerales de la corteza terrestre con el fin de obtener un beneficio económico. La minería se puede realizar a cielo abierto o subterráneo de acuerdo al yacimiento (Fundación Ecológica Arcoíris, 2006, p. 34). Consta de los procesos de:

- **Prospección:** es la búsqueda de áreas que contengan indicios minerales para el desarrollo de proyectos mineros a través del análisis de rocas y sedimentos.
- **Exploración:** este proceso permite identificar la existencia de yacimientos minerales, así como el tipo y cantidad de estos minerales mediante testigos, calicatas y trincheras de exploración.
- **Explotación:** es el conjunto de operaciones y trabajos mineros destinados a la preparación y desarrollo de yacimientos, y a la extracción y transporte de los minerales.
- **Beneficio:** consiste en separar el metal del material extraído, usando procesos mecánicos y químicos.
- **Fundición:** obtención de minerales de alta pureza (Fundación Ecológica Arcoíris, 2006, p. 34).

1.6. Efectos de la actividad minera

RECURSO AIRE

El recurso aire durante la actividad minera es afectado por las emisiones de material particulado y el ruido. A través del aire se transportan gases de mercurio, cianuro, nitrosos, óxido de azufre, gases de escapes de motores (perforadores, compresores, otros) y gases de fundición. En la perforación y voladura así como en el transporte y beneficio de minerales, se genera altas cantidades de polvo. También se producen elevados niveles de ruido debido a motores, generadores de energía eléctrica, compresores, perforadoras, explosiones, locomotoras, otros (Fundación Ecológica Arcoíris, 2006, p. 37).

RECURSO SUELO

El Art. 80 de la Ley de Minería, respecto a la revegetación y reforestación, establece lo siguiente: “Si la actividad minera requiere de trabajos a que obliguen al retiro de la capa vegetal y la tala de árboles, será obligación del titular del derecho minero proceder a la revegetación y reforestación de dicha zona preferentemente con especies nativas, conforme lo establecido en la normativa ambiental y al plan de manejo ambiental” (Ley de Minería, 2013, www.hidrocarburos.gob.ec).

MINEREICIS S.A. mantiene un orden y control estricto en cada uno de sus procesos, gracias a esto, la compañía no causa alteraciones significativas en el suelo y esto se comprueba por la presencia de fauna y flora autóctona. Sin embargo, la presencia de escombreras y la producción de vibraciones que pueden afectar la estructura y firmeza del suelo.

RECURSO AGUA

Los efluentes líquidos de las mineras producen contaminación de vertientes con sedimentos, mercurio, metales pesados, sólidos disueltos, aguas ácidas, aceites, lubricantes, y aguas servidas. Las consecuencias del uso de reactivos químicos pueden alterar aguas superficiales y subterráneas. Además, los contaminantes pueden ser transportados por el agua y contaminar otros medios y organismos (Fundación Ecológica Arcoíris, 2006, p. 28).

1.7. Relaves Mineros

Los relaves son una mezcla tóxica de rocas, tierra, agua, minerales y sustancias químicas, que constituyen un subproducto de procesos mineros, usualmente se componen de un 50% de agua. Esta mezcla debido a su composición debe ser tratada previa a su descarga a una fuente hídrica (Fundación Ecológica Arcoíris, 2006, p. 38).

1.7.1. Composición de los relaves mineros

Sólidos suspendidos totales

Son partículas que pueden ser de origen orgánico e inorgánico y que están presentes en el agua. Este parámetro está directamente relacionado con la turbiedad y color del agua (Doménech y Pérez, 2006, p. 58).

Cianuro total

La actividad minera es una de las principales fuentes de emisión de cianuro, causante de la contaminación de suelo, aire y agua (Fundación Ecológica Arcoíris, 2006, p. 40).

Los cianuros son un grupo de compuestos químicos que dentro de su estructura contienen el grupo cianuro, que es un grupo formado por la unión de un átomo de carbono y un átomo de nitrógeno mediante tres enlaces. Estos compuestos pueden ocurrir en forma natural o por manufactura. Algunos microorganismos como bacterias, hongos y algas tienen la capacidad de producir cianuro. También puede ser encontrado en alimentos y plantas, como por ejemplo en almendras, frijoles, soya, espinaca y raíces de yuca. La mayoría de los cianuros en suelo y agua provienen de procesos antropogénicos, como industrias de sustancias químicas orgánicas, industrias de hierro o acero, incineración de basura, uso de plaguicidas que contienen cianuro, en la minería, entre otros (Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades, 2014, <http://www.atsdr.cdc.gov>).

El cianuro de hidrógeno, de sodio y de potasio son las formas más comunes presentes en el ambiente debido a las actividades industriales. El cianuro de hidrógeno es un gas que ha sido usado para ejecuciones en cámaras de gas y constituye un arma química. Cuando el cianuro entra en contacto con agua una parte se transforma en cianuro de hidrógeno y se evapora, la otra parte es

transformada por los microorganismos, plantas y animales pequeños (Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades, 2014, <http://www.atsdr.cdc.gov>).

Los tiocianatos son un grupo de compuestos que se producen por la reacción del cianuro libre con azufre, esta reacción ocurre en el ambiente y en el cuerpo humano cuando el cianuro ingresa al organismo. Los tiocianatos se encuentran en el agua debido a la contaminación con agua del procesamiento de carbón, la extracción de oro y plata (Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades, 2014, <http://www.atsdr.cdc.gov>).

- **Vías de exposición**

El cianuro puede ingresar al cuerpo por inhalación, ingesta o contacto directo. El cianuro no es bioacumulable, dependiendo de la cantidad y tiempo de exposición estos compuestos pueden abandonar el cuerpo a través de la orina o en forma de anhídrido carbónico 24 horas después de la exposición (Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades, 2014, <http://www.atsdr.cdc.gov>).

Cuando el cianuro ingresa al cuerpo es transformado a tiocianato y de esta forma puede ser eliminado (Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades, 2014, www.atsdr.cdc.gov).

- **Efectos en la salud**

Los efectos agudos de la exposición a cianuro pueden ser:

- Respiración acelerada.
- Convulsiones.
- Pérdida del conocimiento.
- Al contacto, puede producir irritación o ampollas en la piel.

Los efectos crónicos pueden ser:

- Daños al cerebro.
- Daños al corazón.
- Los tiocianatos afectan la glándula tiroides en seres humanos, afectando la producción de hormonas.
- Muerte (Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades, 2014, www.atsdr.cdc.gov).

DQO (Demanda Química de Oxígeno)

Demanda química de oxígeno, es un parámetro que mide la cantidad de oxígeno que necesita el agua para oxidar las sustancias por medios químicos. Este parámetro siempre debe ser mayor que la DBO. Es un indicador de la contaminación del agua ya que es directamente proporcional a la cantidad de materia orgánica presente en el agua (Doménech, y Pérez, 2006, p. 45).

DBO (Demanda Bioquímica de Oxígeno)

Demanda bioquímica de oxígeno, es un parámetro que indica la cantidad de oxígeno necesario para degradar la materia susceptible de ser consumida o transformada por medios biológicos en una muestra líquida. Es un indicador importante de la contaminación en el agua, y al igual que la DQO, se mide en mg/L (Doménech, X; Pérez, J. 2006, p. 45).

Nitritos y nitratos

Nitrato y nitrito son especies iónicas que se encuentran comúnmente disueltas en agua superficial y subterránea, en asociación con iones tales como sodio y potasio. En el ambiente el Nitrito se oxida para formar nitrato, que es un compuesto más estable que el nitrito. Mientras que la transformación

de nitrato a nitrito se puede dar mediante procesos biológicos de plantas o microorganismos (Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades, 2015, p. 3).

El nitrato ingresa a ambientes acuáticos y terrestres de forma natural debido al proceso de descomposición de productos animales y vegetales. Nitrito y nitrato pueden ingresar al aire, agua y suelo debido al proceso de nitrificación realizado por bacterias, el cual consiste en oxidar el amoníaco a nitrito y el nitrito a nitrato (Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades, 2015, p. 4).

Estos compuestos son usados para preservar alimentos y en la fabricación de explosivos y municiones. Además, el nitrato es un nutriente para las plantas, por lo que es comercializado en abonos (Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades, 2015, p. 4).

- **Vías de exposición**

Pueden ingresar al organismo por ingesta de agua o alimentos contaminados y por inhalación. Plantas como la lechuga y espinaca representan aproximadamente el 80% del nitrato que consumen los seres humanos. Algunas carnes contienen nitrato y/o nitrito de sodio como preservativo (Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades, 2015, p. 4).

- **Efectos en la salud**

En el organismo los nitratos son transformados a nitritos y éstos convierten la hemoglobina en metahemoglobina, sustancia que inhibe el transporte de oxígeno en la sangre. Es altamente peligroso para los niños, pudiendo causar la muerte. Además los nitratos pueden formar compuestos cancerígenos y son causantes de metahemoglobina. Se considera que el nitrito puede ser propulsor de cáncer gastrointestinal, pero existen pocos estudios que respaldan esta teoría (Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades, 2015, p. 4).

Metales pesados

Arsénico

El arsénico es un metaloide que se encuentra naturalmente en el ambiente, no se degrada ni se evapora. Su forma orgánica es menos tóxica que la inorgánica. La OMS lo ha declarado como uno de los diez productos químicos causantes de graves problemas de salud pública. El arsénico es utilizado en aleaciones, para el curtido de pieles y en menor cantidad para la fabricación de plaguicidas, piensos y productos farmacéuticos (Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades, 2014, <http://www.atsdr.cdc.gov>).

- **Vías de exposición**

Puede ingresar al organismo por ingesta de agua o alimentos contaminados, por inhalación y por contacto directo (Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades, 2014, <http://www.atsdr.cdc.gov>).

- **Efectos en la salud**

Produce lesiones cutáneas, daños genéticos, malformaciones oculares, renales, complicaciones del embarazo y es cancerígeno (Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades, 2014, <http://www.atsdr.cdc.gov>).

Mercurio

El mercurio se encuentra en el ambiente en tres formas, como mercurio metálico, orgánico e inorgánico. El mercurio metálico se usa para la extracción de oro. A temperatura ambiente el

mercurio metálico es líquido y tiende a evaporarse, formando vapores de mercurio. Estos vapores son incoloros, inodoros y altamente tóxicos, pueden ser transportados en el ambiente y contaminar aire, agua y suelo. El mercurio, usualmente proviene de la actividad volcánica, la erosión de rocas y actividades antropogénicas como: combustión de carbón, uso de calefacciones, incineración y la minería (Organización Mundial de la Salud, 2013, <http://www.who.int>).

Algunas bacterias transforman el mercurio en metilmercurio que es un compuesto bioacumulable y está presente principalmente en peces y mariscos, y es precisamente el consumo de estos alimentos, la vía más común vía de exposición para los seres humanos (Organización Mundial de la Salud, 2013, <http://www.who.int>).

- **Vías de exposición**

Este metal puede ingresar al cuerpo por ingesta, inhalación o contacto directo y se acumula principalmente en los riñones y una pequeña parte en el cerebro (Organización Mundial de la Salud, 2013, <http://www.who.int>).

- **Efectos en la salud**

La mayor parte del mercurio metálico absorbido por el cuerpo se elimina eventualmente en la orina y las heces, y cantidades pequeñas se eliminan en el aire que se expira. La exposición breve a altos niveles de vapores de mercurio metálico en el aire puede dañar el revestimiento de la boca e irritar los pulmones y las vías respiratorias, produciendo opresión del pecho, una sensación de ardor en los pulmones y tos. La inhalación de vapor de mercurio también puede producir náusea, vómitos, diarrea, aumento de la presión o aceleración de los latidos del corazón, erupción de la piel e irritación de los ojos. El mercurio es un compuesto teratogénico ya que puede dañar el cerebro y el sistema nervioso del feto (Organización Mundial de la Salud, 2013, <http://www.who.int>).

Plomo

El plomo es un metal altamente tóxico. La OMS lo ha declarado como uno de los diez productos químicos causantes de graves problemas de salud pública. Las principales fuentes de contaminación por plomo son las actividades mineras, metalúrgicas, baterías plomo-ácido y el uso de pinturas y gasolinas con plomo (Organización Mundial de la Salud, 2015, <http://www.who.int>).

- **Vías de exposición**

Puede ingresar al organismo por inhalación, ingesta o contacto directo. Es bioacumulable (Organización Mundial de la Salud, 2015, <http://www.who.int>).

- **Efectos en la salud**

Este metal causa daños en el cerebro y el sistema nervioso, es teratogénico, mutagénico y puede ingresar al organismo mediante el ciclo del calcio, por lo que se acumula en dientes y huesos. En los niños puede causar problemas cerebrales y del sistema nervioso, mientras que en adultos aumentan el riesgo de hipertensión arterial y lesiones renales. En mujeres embarazadas puede causar aborto o daños en el feto (Organización Mundial de la Salud, 2015, <http://www.who.int>).

Cobre

Es un metal de transición que se encuentra naturalmente en el ambiente y se caracteriza por ser esencial para los seres vivos. Debido a su alta conductividad es usado para fabricar alambres, también se lo usa combinado para elaborar cañerías, láminas de metal, monedas. Además, algunos compuestos de cobre son usados en fungicidas, insecticidas, en plantas de tratamiento de agua,

como conservantes de comida y telas (Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades, 2014, <http://www.atsdr.cdc.gov>).

El cobre puede contaminar agua, aire y suelo debido a las emisiones contaminantes de industrias mineras, agricultura e industrias de manufactura. De manera natural puede ocurrir como resultado de las emisiones de volcanes, vegetación en descomposición e incendios forestales (Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades, 2014, <http://www.atsdr.cdc.gov>).

- **Vías de exposición**

Puede ingresar al organismo por inhalación, ingesta o contacto directo (Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades, 2014, <http://www.atsdr.cdc.gov>).

- **Efectos en la salud**

Los seres humanos pueden asimilar cantidades relativamente elevadas de cobre pero la exposición a altas concentraciones puede causar irritación de la nariz, boca y ojos, dolores de cabeza, mareos, vómito y diarrea. La ingesta de altas cantidades puede dañar el hígado, los riñones y e incluso producir la muerte (Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades, 2014, <http://www.atsdr.cdc.gov>).

Hierro

Es un metal muy abundante en la corteza terrestre, es usado para fabricar aceros estructurales. Su presencia en el agua produce una coloración rojiza. En el cuerpo humano el hierro se combina con proteínas y cobre para producir hemoglobina. La deficiencia de hierro puede causar anemia ferropénica. Los niveles recomendables de consumo de hierro son 0.15–0.27 mg/kg/día para evitar

la deficiencia del metal (Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades, 2006, <http://www.atsdr.cdc.gov>).

- **Vías de exposición**

Puede ingresar al organismo por inhalación, ingesta o contacto directo (Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades, 2006, <http://www.atsdr.cdc.gov>).

- **Efectos en la salud**

El hierro es perjudicial para la salud cuando se consume en cantidades extremadamente grandes, las dosis de 200 mg o mayores, pueden causar intoxicación o muerte de un niño. En exceso puede causar conjuntivitis, coriorretinitis, retinitis y su inhalación aumenta la probabilidad de desarrollar cáncer de pulmón (Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades, 2006, <http://www.atsdr.cdc.gov>).

Níquel

El níquel es un metal duro presente en la naturaleza, es blanco-plateado, usado ampliamente para fabricar acero inoxidable. El níquel es un elemento natural muy abundante. A nivel industrial es ampliamente usado para formar aleaciones junto con otros metales y principalmente sirve para la fabricación de acero inoxidable. El níquel cuando se combina con otros elementos forma compuestos que son usados en el niquelado, en cerámicas, fabricación de baterías y como catalizadores de reacciones químicas (Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades, 2014, <http://www.atsdr.cdc.gov>).

De forma natural, se libera níquel en emisiones volcánicas, y de forma antropogénica es liberado por industrias que usan o manufacturan níquel o compuestos del metal, también puede provenir de

petroleras y de la incineración de carbón y basura. Cuando se libera níquel al aire, éste se adhiere a partículas y se sedimenta en el suelo, pudiendo pasar a otros medios y contaminarlos (Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades, 2014, <http://www.atsdr.cdc.gov>).

- **Vías de exposición**

Puede ingresar al organismo por inhalación, ingesta o contacto directo (Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades, 2014, <http://www.atsdr.cdc.gov>).

- **Efectos en la salud**

Como efectos agudos el níquel puede producir salpullido debido al contacto directo y dolor de estómago cuando es ingerido. Mientras que los efectos crónicos debido a la exposición a concentraciones elevadas de níquel, pueden incluir lesiones cutáneas, el inhalar grandes cantidades produce bronquitis crónica, cáncer del pulmón y de los senos nasales, alteraciones en la sangre y daño a los riñones (Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades, 2014, <http://www.atsdr.cdc.gov>).

1.8. Tratamiento de relaves mineros

Existen varios métodos para tratar los efluentes mineros, el tratamiento químico de coagulación-floculación es uno de los más aplicados, pero este método es costoso y usa agentes químicos que pueden ser potenciales contaminantes. La fitorremediación también ha sido estudiada para tratar relaves mineros, pero su aplicación y eficiencia son limitadas.

La biorremediación aún no ha sido estudiada a profundidad para tratar relaves mineros, pero su eficiencia en aguas residuales industriales la convierte en una alternativa interesante para ser

aplicada en este tipo de efluentes. Además es un método de bajo costo y amigable con el ambiente (Castillo, 2005, p. 366).

1.9. Biorremediación

La Biorremediación es la aplicación de métodos que usan microorganismos para reciclar materiales orgánicos y separar iones inorgánicos. Para realizar estos procesos es necesario aportar las condiciones óptimas. La biorremediación presenta ventajas con respecto a técnicas físico – químicas para eliminar contaminantes, ya que es un proceso natural, los productos formados son generalmente inocuos y la relación costo/efectividad es menor comparada con otras tecnologías (Castillo, 2005, p. 366).

1.9.1. Tipos de Biorremediación

- Biorremediación in situ: se refiere al tratamiento de compuestos tóxicos en el lugar donde se produce la contaminación. Este método se puede dar por bioaumentación o bioestimulación.

- Biorremediación ex situ: El tratamiento se realiza en espacios destinados para dicha actividad, esto se puede llevar a cabo en laboratorios especializados, y generalmente se utiliza biorreactores (Castillo, 2005, p. 367).

1.9.2. Bacterias

Las bacterias son microorganismos con una célula única relativamente simples. Dado que su material genético no está encerrado por una membrana nuclear, las células bacterianas son procariontes. Las células bacterianas suelen presentar diversas formas: de bastón, esférica u oval, curvadas, estrelladas y cuadradas. Las bacterias suelen formar pares, cadenas, racimos u otros

agrupamientos; estas formaciones suelen ser características de un género o especie específico (Tortora, 1993, p. 3).

Las bacterias están recubiertas por paredes celulares que en gran parte están constituidas por un complejo de carbohidratos y proteínas denominado peptidoglicano. Se reproducen por división celular. Se alimentan de sustancias químicas orgánicas que pueden provenir de organismos muertos o vivos, algunas pueden producir sus propios alimentos y otras pueden nutrirse de sustancias inorgánicas (Tortora, 1993, p. 3).

1.9.3. Aislamiento de bacterias

El aislamiento consiste en obtener un cultivo puro de bacterias a partir de una muestra. Debe ser realizado en un laboratorio. Los cultivos se realizan en medios de cultivo enriquecidos con los compuestos que se van a estudiar. Para que se desarrollen las bacterias es necesario aportar las condiciones de vida adecuadas (Hernández, 2003, p. 357). Para obtener un cultivo puro, puede ser necesario realizar varios cultivos con distintas diluciones. Una vez aislado el cultivo, puede ser identificado mediante pruebas bioquímicas o PCR.

1.10. Arsénico

El arsénico es un elemento que se encuentra de forma natural en el suelo, agua y aire, es el 20vo elemento más abundante en la tierra, el 14vo más abundante en el mar y el 12vo en el cuerpo humano (Arsénico, 2010, <http://bvs.per.paho.org>).

Los compuestos de arsénico pueden clasificarse en 3 grandes grupos:

1. Inorgánicos,
2. Orgánicos, y
3. Gas arsina.

Las valencias más comunes son:

1. As(0) (arsénico metaloide, estado de oxidación 0),
2. As(III) (trivalente, estado de oxidación 3, como en los arsenitos),
3. As(V) (pentavalente, estado de oxidación 5, como en los arseniatos), y
4. Gas Arsina (estado de oxidación -3) (Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades, 2014, <http://www.atsdr.cdc.gov>).

La toxicidad de los compuestos de arsénico de mayor a menor es la siguiente:

1. Compuestos inorgánicos trivalentes,
2. Compuestos orgánicos trivalentes,
3. Compuestos inorgánicos pentavalentes,
4. Compuestos orgánicos pentavalentes y
5. Arsénico elemental.

El gas arsina es el compuesto de arsénico más tóxico, pero raras veces puede encontrarse en concentraciones tóxicas en el aire (Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades, 2014, <http://www.atsdr.cdc.gov>).

Algunos organismos han desarrollado sistemas de resistencia al arsénico. En el caso de los microorganismos, algunos presentan genes que les dan la capacidad de realizar transformaciones de oxidación o reducción de arsénico (Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades, 2014, <http://www.atsdr.cdc.gov>).

Los compuestos de arsénico generalmente se acumulan en el hígado, riñón, pulmón y bazo. El As (III) se une a los grupos sulhidrilo de proteínas como la queratina, por lo que se deposita en pelo y uñas. El metabolismo del arsénico aún no está esclarecido totalmente, pero se conoce que principalmente se realiza en el hígado, e intervienen los procesos de reducción del As (V) a As (III), y las reacciones de metilación oxidativa, que transforman el As (III) en especies metiladas. Finalmente se excreta por la orina (Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades, 2014, <http://www.atsdr.cdc.gov>).

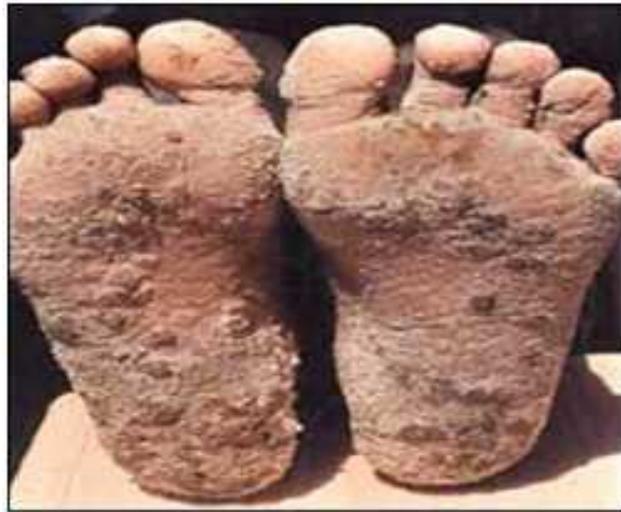


Figura 2-1 Efectos causados por la exposición a Arsénico en pies.
Fuente: (El Diario, 2012)



Figura 3-1 Efectos causados por la exposición a Arsénico en manos.
Fuente: (El Mundo, 2011)

1.11. Arsenito de sodio

Características

Fórmula molecular: NaAsO₂

Aspecto: Polvo higroscópico blanco o gris.

Masa molecular: 129,91

Solubilidad: Soluble en agua muy elevada.

Punto de ebullición: 160°C

Punto de fusión: 615°C

Densidad: 1,87 g/cm³

Peligro químico: Por calentamiento produce humos tóxicos.

Reacciona con ácidos y oxidante fuertes formando arsina.

Ataca a muchos metales formando un gas combustible y arsina.

Clasificación de riesgos, según la Asociación Nacional para la Protección contra Incendios (NFPA): 0=mínimo; 1=poco; 2=moderado; 3=grave; 4=extremo.

- Salud: 3 Seriamente peligroso
- Inflamabilidad: 0 Mínimamente peligroso
- Reactividad: 0 Mínimamente peligroso
- EPP: E Anteojos de seguridad, guantes y respirado para polvos.

El arsenito de sodio es un polvo blanco o gris. Está considerado dentro de la Lista de Substancias Peligrosas debido a sus efectos cancerígenos, mutanogénicos y teratogénicos. Razón por la cual, existen límites máximos permisibles para este compuesto. Puede ser inhalado, absorbido por la piel y ser ingerido (Fichas internacionales de seguridad química, 2006, <http://www.insht.es>).

De acuerdo a la Administración de Salud y Seguridad en el Trabajo OSHA (Occupational Safety and Health Administration), el límite de exposición en el aire es un promedio de 0,01mg/m³ durante 8 horas laborables. El Instituto Nacional para la Salud y Seguridad en el Trabajo NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health), recomienda como límite de de exposición en el aire

0,002 mg/m³ para arsénico inorgánico, que no debe sobrepasarse en un periodo laboral de 15 min. Y según la Conferencia Estadounidense de Higienistas Industriales Gubernamentales ACGIH (American Conference of Gubernamental Industrial Hygienists), la concentración en el aire no debe ser mayor a un promedio de 0,01mg/m³ durante 8 horas laborables (Fichas internacionales de seguridad química, 2006, <http://www.insht.es>).

El arsenito de sodio es usado en productos agrícolas como pesticidas, en la industria de pieles para conservar el cuero y en productos de uso humano como antiséptico y en jabones (Fichas internacionales de seguridad química, 2006, <http://www.insht.es>).

Los efectos agudos, es decir, aquellos que ocurren inmediatamente después de la exposición al arsenito de sodio son:

- Irritación de la piel.
- Picazón y salpullido en las áreas de la piel que entraron en contacto.
- Al inhalarlo causa irritación en nariz y garganta.
- Dolores de estómago, náuseas y vómitos.
- Dolor de cabeza (Fichas internacionales de seguridad química, 2006, <http://www.insht.es>).

Mientras que los efectos crónicos, que se manifiestan tiempo después de la exposición y que pueden durar meses o años, son:

- Cáncer de piel. Puede ser tratado si se detecta a tiempo.
- Cáncer de pulmón
- Puede causar daño al feto o malformaciones en recién nacidos. Teratogénico.
- Constante inhalación puede producir úlceras y perforaciones en el hueso interno de la nariz.
- Daño a los nervios, disminuyendo la coordinación en brazos y piernas.
- Constante contacto con la piel puede causar engrosamiento de piel y cambios de color (Fichas internacionales de seguridad química, 2006, <http://www.insht.es>).

Control Laboral

Las personas que trabajan con este compuesto químico pueden presentar daños en su salud, por eso es indispensable realizarse exámenes médicos periódicamente, para descartar problemas, y en el caso del arsenito de sodio se recomienda realizar exámenes de nariz, piel, ojos, uñas y del sistema nervioso, además de la determinación de arsénico en la orina. Es preciso corroborar las pruebas, ya que el consumo de mariscos puede aumentar la concentración de arsénico en la orina, pero este arsénico no es el perjudicial. El Instituto Nacional para la Salud y Seguridad en el Trabajo (NIOSH) recomienda un valor de 100 microgramos por gramo de creatinina en los exámenes de orina (Fichas internacionales de seguridad química, 2006, <http://www.insht.es>). También es importante mantener un máximo control en las áreas de trabajo que usen arsenito de sodio, tales como:

- Ventilación
- Operaciones aisladas.
- Uso de Equipos de Protección Personal.
- Uso de lavajos y duchas.

1.12. Arsenato de sodio

Características

Nombre Químico: Arsenato de sodio heptahidratado.

Fórmula molecular: $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Aspecto: Cristales incoloros e inodoros.

Masa molecular: 312,01

Solubilidad: En agua, g/100mL a 0°C = 5,46

Punto de ebullición: 180°C (se descompone)

Punto de fusión: 130°C

Densidad: 1,9 g/cm³

Peligro químico: Se descompone al calentarlo intensamente, produciendo humos tóxicos, incluyendo arsénico y óxidos de arsénico. Reacciona violentamente con oxidante fuerte, ácidos fuertes y metales como: hierro, aluminio y zinc, originando peligro de incendio y explosión (Fichas internacionales de seguridad química, 1994, <http://www.insumoslabcentral.unlu.edu.ar>).

Clasificación de riesgos NFPA:

- Salud: 3 Ligeramente peligroso
- Inflamabilidad: 0 Ligeramente peligroso
- Reactividad: 0 Mínimamente peligroso
- EPP: C Anteojos de seguridad, guantes y mandil.

El arsenato de sodio es un compuesto químico inorgánico, considerado posiblemente cancerígeno, pero a diferencia del arsenito de sodio, es menos tóxico, por lo tanto no existen controles rigurosos como en el caso del arsenito. Su aplicación a nivel industrial es limitada, en algunos países es usado como insecticida (Fichas internacionales de seguridad química, 1994, <http://www.insumoslabcentral.unlu.edu.ar>).

Puede ingresar al organismo por ingesta, inhalación o contacto directo. Cuando ingresa al organismo es transformado a la forma trivalente y luego es excretado por la orina. El arsénico de valencia pentavalente, en el organismo puede substituir al grupo fosfato, afectando a los procesos de producción de ATP y síntesis de ADN, sin embargo, su toxicidad es difícil de determinar ya que el As (V) se reduce a As (III) dentro del organismo (Fichas internacionales de seguridad química, 1994, <http://www.insumoslabcentral.unlu.edu.ar>).

Los efectos agudos, presentados inmediatamente luego de la exposición a arsenato de sodio son:

- Irritación de ojos, piel y tracto respiratorio.
- Puede causar alteraciones en el sistema cardiovascular, en el tracto gastrointestinal y en el sistema nervioso central.
- Puede producir hemorragias, pérdida de fluidos, colapso, shock y muerte.

Los efectos crónicos que se presentan cuando hay una exposición prolongada a arsenato de sodio, son:

- Dermatitis.
- Sensibilización de la piel.
- Daños al hígado, riñón y al sistema nervioso periférico.
- Neuropatías.
- Alteraciones de pigmentación.
- Perforaciones del tabique nasal.
- Puede ser cancerígeno (Fichas internacionales de seguridad química, 1994, <http://www.insumoslabcentral.unlu.edu.ar>).

1.13. El Arsénico en el ambiente

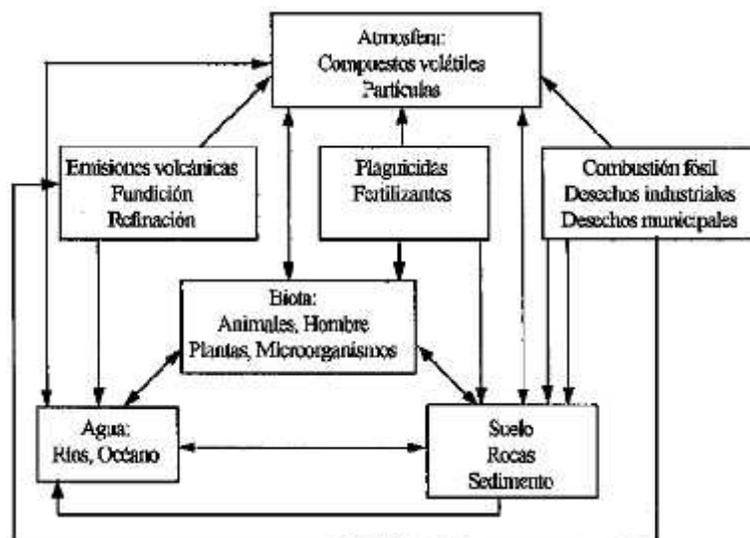


Figura 4-1 Ciclo del Arsénico en el ambiente.
Fuente: (Albores *et al.*, p. 248)

El arsénico es un metaloide que se encuentra de forma natural en el ambiente. Puede llegar al agua debido a la disolución de minerales o por efluentes industriales. La constitución geológica del suelo influye en la presencia de arsénico en el agua, es así, que en algunos casos las aguas subterráneas pueden contener altas concentraciones del metal (Manahan, 2007, p. 152).

La contaminación del agua con arsénico está relacionada con la presencia de hierro, azufre y materia orgánica. Las rocas al erosionarse por el agua liberan hierro, que forman depósitos de óxido de hierro en las partículas de las rocas desprendidas, este óxido acumula arsénico y lo concentra. Las partículas luego son enterradas con la materia orgánica en los sedimentos y el hierro (III) se convierte en hierro (II), que es soluble en las condiciones anaeróbicas bajo las que se degrada la materia orgánica. Al solubilizarse el hierro, se libera el arsénico enlazado y éste entra en el agua. (Manahan, 2007, p. 153).

1.14. Descontaminación de Arsénico

Existen varios métodos para descontaminar ambientes con arsénico, la mayoría de ellos consiste en oxidar el As (III) a As (V), ya que este último tiene menor movilidad y es menos tóxico (Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades, 2014, <http://www.atsdr.cdc.gov>).

1.14.1. Filtración

El proceso de filtración convencional, es un tratamiento físico que consiste en separar partículas sólidas del agua mediante el uso de una membrana o filtro que retiene al sólido en su superficie y permite que el agua pase a través. Este método es usado como complementario luego de aplicar procesos de floculación, sedimentación, adsorción y / o metabolismo biológico. El filtro puede ser de diferentes materiales como: arena, carbón, carbón activado, grafeno, entre otros. La tecnología para el tratamiento de agua contaminada con arsénico se basa en la aplicación de un filtro de arena, pero este proceso se debe realizar después de aplicar coagulación (Simeonova, 2004, <http://scd-theses.u-strasbg.fr>).

1.14.2. Adsorción

Este proceso consiste en la transferencia de una sustancia disuelta o suspendidas en un líquido, a la superficie de un sólido. Existen diferentes materiales para realizar la adsorción de contaminantes en el agua, los mejores son aquellos que tienen mayor superficie y por lo tanto mayor capacidad de acumular material. El material a usar depende del tipo y concentración del contaminante presente en el agua (Simeonova, 2004, <http://scd-theses.u-strasbg.fr>).

En el caso de compuesto de arsénico, se ha comprobado que tienen una mejor adsorción sobre arcilla, óxidos metálicos o hidróxidos de Hierro, Aluminio o Manganeso, y los adsorbentes orgánicos a base de celulosa, tales como:

- Óxidos: óxido hidratado férrico, óxido de aluminio, óxido de titanio, óxido de silicio, etc.;
- Los minerales que contienen Hierro, Aluminio o Manganeso;
- Los minerales de arcilla - caolinita, bentonita, zeolita, etc.;
- Resinas de intercambio aniónico sintéticos;
- La quitina y el quitosano;
- Materiales de celulosa: aserrín, pulpa periódico (Simeonova, 2004, <http://scd-theses.u-strasbg.fr>).

1.14.3. Coagulación

Esta técnica consiste en obtener partículas coloidales que sean precipitables y fáciles de remover del agua. Para este proceso es necesario considerar la valencia del contaminante y el pH del medio. Los precipitados que se forman son complejos insolubles formados por el contaminante inorgánico y el coagulante (Simeonova, 2004, <http://scd-theses.u-strasbg.fr>).

Mediante la coagulación, el arsénico disuelto se convierte en productos de reacción insolubles, los cuales se pueden eliminar por sedimentación y / o filtración. La ventaja de la coagulación es el alto porcentaje de adsorción de arsenato usando hidróxidos de hierro, y las desventajas son la necesidad de un agente oxidante durante el proceso, como hipoclorito y peróxido de hidrógeno, y el uso excesivo de sales de hierro, lo que significa que luego se deben aplicar nuevos tratamientos para eliminar el hierro del agua. Además, en algunos casos se debe utilizar HCl para controlar el pH del agua a tratar, ya que el proceso es más eficiente en soluciones ácidas (Simeonova, 2004, <http://scd-theses.u-strasbg.fr>).

1.14.4. Oxidación

Son métodos químicos que consisten en aplicar agentes para oxidar el arsénico que se encuentra en el agua, para esto se usa generalmente como agentes oxidantes el hipoclorito y peróxido de hidrógeno o permanganato. Uno de los métodos más estudiados es la Reacción de Fenton, que es una tecnología de oxidación ampliamente aplicada, que utiliza la reacción de peróxido de hidrógeno con hierro para producir radicales capaces de oxidar los contaminantes en agua. La desventaja de esta técnica es que se pueden formar subproductos organoclorados que pueden causar igual o mayor contaminación ambiental (Simeonova, 2004, <http://scd-theses.u-strasbg.fr>).

En los últimos años también se ha estudiado una nueva técnica denominada peroxidación electroquímica, para la oxidación de As (III), este método se basa en la aplicación de corriente eléctrica a un electrodo de acero, que se complementa con una pequeña adición de H₂O₂ (Simeonova, 2004, <http://scd-theses.u-strasbg.fr>).

1.14.5. Intercambio iónico

Este proceso consiste en el intercambio de iones entre un sólido y la fase líquida, durante el proceso, el sólido no sufre ninguna alteración permanente en su estructura. Resinas de intercambio iónico sintéticas generalmente están compuestas de poliestireno con vinilbenceno. Los grupos

funcionales cargados presentes en el agua, se unen a la resina a través de enlaces covalentes. Para llevar a cabo este proceso, generalmente se usa columnas de lecho compacto de flujo descendente, a través de las cuales circula en agua contaminada hasta reducir las concentraciones de los contaminantes presentes (Simeonova, 2004, <http://scd-theses.u-strasbg.fr>).

Las resinas selectivas de sulfato y las resinas selectivas de nitrato, eliminan eficazmente el arsénico presente en el agua. El potencial redox y el pH son factores importantes con respecto a la eliminación de arsénico por esta técnica (Simeonova, 2004, <http://scd-theses.u-strasbg.fr>).

1.14.6. Ósmosis inversa

Esta técnica se basa en el uso de membranas semi-permeables selectivas, que permiten el paso del agua y retiene a los sólidos disueltos o suspendidos. En este proceso es fundamental aplicar una presión superior a la presión osmótica para producir el efecto contrario a la ósmosis (Simeonova, 2004, <http://scd-theses.u-strasbg.fr>).

Las membranas utilizadas para los sólidos disueltos, son eficaces también para remover compuestos de arsénico. La gran ventaja de este proceso es que su porcentaje de eficiencia con respecto al arsénico y otros contaminantes es alta. Y su desventaja es que es muy costoso, por lo tanto su aplicación es limitada (Simeonova, 2004, <http://scd-theses.u-strasbg.fr>).

1.14.7. Tratamientos biológicos

Los tratamientos biológicos son aquellos en los cuales se usan plantas o microorganismos para remediar ambientes contaminados. Estos tratamientos son los más amigables con el ambiente, ya que no usan sustancias químicas sintéticas, y generalmente no producen subproductos peligrosos. Este tipo de tratamiento se puede llevar a cabo mediante procesos de oxidación biológica, reducción

biológica, biosorción, bioprecipitación, biomineralización, rizofiltración, fitoextracción, entre otros (Castillo R., 2005, p. 32).

Los microorganismos son los más usados en los tratamientos biológicos porque en comparación con las plantas, tienen una alta resistencia o tolerancia a los contaminantes, además su tiempo de acción es menor.

En el caso del arsénico, actualmente se llevan a cabo estudios para reducir este compuesto en el medio con la utilización de bacterias y plantas. Además, se han desarrollado microorganismos y plantas genéticamente modificadas para aumentar su capacidad de reducir el metal.

1.14.8. Biorremediación de arsénico

Oxidación de compuestos de Arsénico

A nivel celular el arsenito es transportado por acuagliceroporinas, que son proteínas ubicadas en la membrana celular y permiten el transporte de agua y glicerol. En 1992 se aisló la primera arsenito oxidasa (AOX) de *Alcaligenes faecalis* (Anderson et al., 1992; citados en Pacheco et al, 2013. p. 94). Esta enzima participa tanto en la desintoxicación de arsénico en bacterias heterótrofas (Muller et al., 2003; citados en Pacheco et al, 2013. p. 94) como en la generación de energía en bacterias quimioheterótrofas (bacterias cuya fuente de carbono es la materia orgánica) y quimiolitotróficas (bacterias aerobias cuya fuente de carbono es el CO₂) (Santini et al., 2004; citados en Pacheco et al, 2013. p. 94).

La AOX es una enzima redox periplasmática, es decir, que está comprendida en el espacio entre la membrana interna y externa de las bacterias, que presenta una estructura heterodimérica que consta de dos subunidades: la subunidad mayor que es la catalítica, presenta un centro de molibdeno y un centro [3Fe-4S] y la subunidad menor formada por un centro Rieske [2Fe-2S] (Ellis et al., 2001; citados en Pacheco et al, 2013. p. 94).

Los genes que codifican estas dos subunidades fueron identificados y secuenciados por primera vez en la bacteria heterotrófica *Herminiimonas arsenicoxydans*, y se demostró que ambos genes están en el mismo operón (conjunto de genes que codifican la síntesis de un grupo de proteínas relacionadas) denominado *aox* (Muller et al., 2003; citados en Pacheco et al, 2013, p. 94).

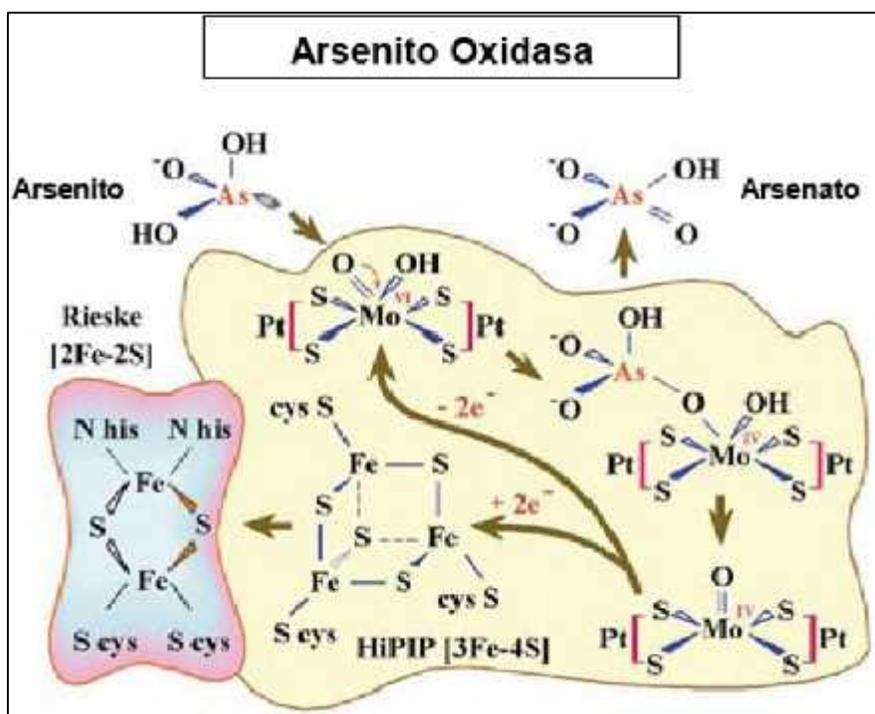


Figura 5-1 Modelo de la enzima arsenito oxidasa.

Fuente (Silver y Phung, 2005; citados en Pacheco et al, 2013, p. 95)

Se ha propuesto un mecanismo de oxidación del arsenito por esta enzima, que consiste en que el As (III) ingresa a través de un orificio cónico presente en la superficie de la enzima, entrando en contacto directo con el Molibdeno (VI); inmediatamente después se produce una transferencia de dos electrones y ahora el arseniato es liberado a través del mismo orificio de entrada y el molibdeno es reducido a Molibdeno (IV). Posteriormente, se transfieren los electrones primero al grupo [3Fe-4S], dentro de la subunidad grande Mo-pterina de la proteína, y después al grupo [2Fe-2S] situado en la subunidad pequeña. A partir de ese sitio, los electrones se transfieren a la cadena respiratoria de la membrana interna. (Anderson et al., 1992, Ellis et al., 2001, Hoke et al., 2004; Silver y Phung, 2005a; Mukhopadhyay et al., 2002; citados en Pacheco et al, 2013. p. 95).

Reducción de compuestos de Arsénico

A nivel celular el arseniato se moviliza a través del transportador de fosfato. La principal diferencia en la adsorción celular de As (III) y As (V) radica en que el As (III) es absorbido directamente en la célula y el As (V) compete con el fosfato para la absorción. En ambientes marinos el arseniato (AsO_3^{4-}) es abundante y algunos organismos como el fitoplancton, algunos moluscos, peces, algas y crustáceos tienen la capacidad de reducirlo a arsenito (AsO_3^{3-}) (Castillo, 2005, p. 240).

La reducción de arsénico por microorganismos se debe a la presencia del gen *ars*. Algunos poseen este gen generalmente en operones de plásmidos, pero en *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *Mycobacterium tuberculosis* el gen se encuentra en el cromosoma. Existen, al menos, tres tipos de enzimas arsenato reductasas (ArsC). Algunas bacterias como la *E. coli* emplean glutarredoxina y glutatión para la reducción. Otras como el *S. aureus*, emplean tiorredoxina (proteína que facilita la reducción de otras proteínas) como reductor. Y las terceras, como la *S. cerevisiae*, usan proteínas de la familia de las tirosina fosfatasas (Castillo, 2005, p. 240).

Metilación de compuestos de Arsénico

En la naturaleza, los compuestos de arsénico inorgánicos pueden ser metilados bajo la acción de microorganismos, mediante este proceso se pueden formar compuestos volátiles y no volátiles. En ambientes aeróbicos, las bacterias producen ácido monometilarsénico, ácido dimetilarsénico y óxido trimetilarsénico. Mientras que en condiciones anaerobias el arsénico inorgánico está sometido a la metil reducción para volatilizar y facilitar la oxidación de metilarsinas. Estos compuestos son menos tóxicos que los arsenitos y arsenatos. Bacterias como *Alcaligenes sp.* y *Pseudomonas sp.* Bajo condiciones anaeróbicas son capaces de reducir arsenito y arsenato al compuesto volátil arsina (Castillo, 2005, p. 240).

1.1. Normativa Legal

1.1.1. Plan Nacional del Buen Vivir

En la Constitución de 2008, Ecuador reconoce los derechos de la naturaleza, orientados al respeto integral, el cuidado, el mantenimiento y la regeneración los ciclos vitales y procesos evolutivos del ambiente.

Desde entonces, la gestión del gobierno se orienta al cumplimiento de los principios y derechos del Buen Vivir o Sumak Kawsay, dentro de estos, son primordiales la interculturalidad y la convivencia armónica con la naturaleza.

Es importante destacar que el presente proyecto se relaciona directamente con el Sumak Kawsay y se enfoca en los siguientes Objetivos Nacionales del Buen Vivir:

Objetivo 7: “Garantizar los derechos de la naturaleza y promover la sostenibilidad ambiental territorial y global”.

Dentro de este objetivo se busca una responsabilidad ética con las actuales y futuras generaciones para alcanzar un adecuado desarrollo humano. Ecuador tiene importantes recursos naturales que durante muchas décadas han sufrido un gran impacto debido a las urgentes necesidades de su población. Por lo tanto, la nueva propuesta se basa en aprovechar de manera adecuada nuestros recursos, y esto se logrará mediante un modelo ecoeficiente, que plantea como prioridades la conservación y el uso sostenible del patrimonio natural y sus recursos, la inserción de tecnologías limpias, la eficiencia energética y el uso de energías renovables, así como la prevención, el control y la mitigación de la contaminación (Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo, 2013, <http://www.planificacion.gob.ec>).

Objetivo 8: “Consolidar el sistema económico social y solidario, de forma sostenible”.

Este objetivo pretende consolidar el sistema económico social y solidario, de forma sostenible, priorizando el desarrollo de capacidades y complementariedades humanas por encima del capital.

Lo que se logrará con el cambio de la matriz productiva y con la descentralización y reordenamiento, que permitirá realizar una inversión adecuada de los recursos públicos hacia la potenciación de capacidades, los sectores estratégicos y la promulgación de las economías populares y solidarias (Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo, 2013, <http://www.planificacion.gob.ec>).

Esto significa que el gobierno incentivará a mejorar los sistemas productivos de la minería, ya que dicha actividad consta dentro de los sectores estratégicos del país. Este paso servirá para generar mayor conciencia ambiental.

Objetivo 11: “Asegurar la soberanía y eficiencia de los sectores estratégicos para la transformación industrial y tecnológica”.

La Constitución de Montecristi define a los sectores estratégicos como aquellos que, por su trascendencia y magnitud, tienen decisiva influencia económica, social, política o ambiental en el país, y que están orientados al pleno desarrollo de los derechos de los ciudadanos y al interés general. Se han catalogado como sectores estratégicos a los que comprometen el uso de recursos naturales no renovables, como hidrocarburos y minería, y recursos naturales renovables como agua, biodiversidad y patrimonio genético. Además, han sido catalogados como estratégicos, la energía en todas sus formas, las telecomunicaciones y el espectro radioeléctrico (Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo, 2013, <http://www.planificacion.gob.ec>).

Por lo tanto, es el Estado quien llevará la administración, control y gestión de los sectores estratégicos, lo que constituye un beneficio para la minería, ya que conjuntamente con las compañías, el Estado trabajará y apoyará para lograr una sostenibilidad ambiental.

1.1.2. Ley de Minería

El Art. 1 de la Ley de Minería (2013) establece: “La Ley de Minería norma el ejercicio de los derechos soberanos del Estado Ecuatoriano, para administrar, regular, controlar y gestionar el sector estratégico minero, de conformidad con los principios de sostenibilidad, precaución, prevención y eficiencia.”

“El Estado podrá delegar su participación en el sector minero, a empresas mixtas mineras en las cuales tenga mayoría accionaria, o a la iniciativa privada y a la economía popular y solidaria, para la prospección, exploración y explotación, o el beneficio, fundición y refinación, si fuere el caso, además de la comercialización interna o externa de sustancias minerales.”

El Art. 6 nos indica: “La Política Minera Nacional tenderá a promover en todos los niveles la innovación, la tecnología y la investigación que permitan un desarrollo interno del sector, para este proceso el Ministerio Sectorial coordinará con las instancias de ciencia y tecnología y de altos estudios que existen en el país.”

“El Estado establecerá mecanismos de fomento, asistencia técnica, capacitación y de financiamiento para el desarrollo sustentable para la minería artesanal y pequeña minería. Así mismo, establecerá sistemas de incentivos para la protección ambiental y generación de unidades productivas más eficientes.”

En cuanto a los organismos de control, el Art. 8 de la Ley establece lo siguiente: “La Agencia de Regulación y Control Minero, es el organismo técnico-administrativo, encargado del ejercicio de la potestad estatal de vigilancia, auditoría, intervención y control de las fases de la actividad minera que realicen la Empresa Nacional Minera, las empresas mixtas mineras, la iniciativa privada, la pequeña minería y minería artesanal y de sustento, de conformidad con las regulaciones de esta ley y sus reglamentos.”

En cuanto al resarcimiento de daños y perjuicios, el Art. 70 establece: “Los titulares de concesiones y permisos mineros están obligados a ejecutar sus labores con métodos y técnicas que minimicen los daños al suelo, al medio ambiente, al patrimonio natural o cultural, a las concesiones colindantes, a terceros y, en todo caso, a resarcir cualquier daño o perjuicio que causen en la realización de sus trabajos.”

“La inobservancia de los métodos y técnicas a que se refiere el inciso anterior se considerará como causal de suspensión de las actividades mineras; además de las sanciones correspondientes.”

El Capítulo II de la Ley de Minería (2009), establece los parámetros para la preservación del medio ambiente. El Art. 78 indica: “Los titulares de derechos mineros, previamente a la iniciación de las actividades, deberán elaborar y presentar estudios o documentos ambientales, para prevenir, mitigar, controlar y reparar los impactos ambientales y sociales derivados de sus actividades; estudios o documentos que deberán ser aprobados por la Autoridad Ambiental competente, con el otorgamiento de la respectiva.”

Art. 79, con respecto al tratamiento de aguas, establece: “Los titulares de derechos mineros y mineros artesanales que, previa autorización de la autoridad única del agua, utilicen aguas para sus trabajos y procesos, deben devolverlas al cauce original del río o a la cuenca del lago o laguna de donde fueron tomadas, libres de contaminación o cumpliendo los límites permisibles establecidos en la normativa ambiental y del agua vigentes, con el fin que no se afecte a los derechos de las personas y de la naturaleza reconocidos constitucionalmente.”

“El tratamiento a darse a las aguas para garantizar su calidad y la observancia de los parámetros de calidad ambiental correspondientes, deberá preverse en el respectivo sistema de manejo ambiental, con observancia de lo previsto en las leyes pertinentes y sus reglamentos.”

“La reutilización del agua, a través de sistemas de recirculación es una obligación permanente de los concesionarios”

“Dependiendo del grado de incumplimiento de esta disposición, podrá disponerse la suspensión temporal o definitiva de las actividades mineras, a cuyo efecto se seguirá el procedimiento establecido en esta Ley y su reglamento general.”

Art. 80, de la revegetación y reforestación: “Si la actividad minera requiere de trabajos a que obliguen al retiro de la capa vegetal y la tala de árboles, será obligación del titular del derecho minero proceder a la revegetación y reforestación de dicha zona preferentemente con especies nativas, conforme lo establecido en la normativa ambiental y al plan de manejo ambiental.”

Art. 81, de la acumulación de residuos y prohibición de descargas de desechos: “Los titulares de derechos mineros y mineros artesanales, para acumular residuos minero-metalúrgicos deben tomar estrictas precauciones que eviten la contaminación del suelo, agua, aire y/o biota de los lugares donde estos se depositen, en todas sus fases incluyendo la etapa de cierre, construyendo instalaciones como escombreras, rellenos de desechos, depósitos de relaves o represas u otras infraestructuras técnicamente diseñadas y construidas que garanticen un manejo seguro y a largo plazo.”

“Se prohíbe la descarga de desechos de escombros, relaves u otros desechos no tratados, provenientes de cualquier actividad minera, hacia los ríos, quebradas, lagunas u otros sitios donde se presenten riesgos de contaminación.”

“El incumplimiento de esta disposición ocasionará sanciones que pueden llegar a la caducidad de la concesión o permiso.”

Art. 82, de la conservación de la flora y fauna: “Los estudios de impacto ambiental y los planes de manejo ambiental, deberán contener información acerca de las especies de flora y fauna existentes en la zona, así como realizar los estudios de monitoreo y las respectivas medidas de mitigación de impactos en ellas.”

Art. 83, del manejo de desechos: “El manejo de desechos y residuos sólidos, líquidos y emisiones gaseosas que la actividad minera produzca dentro de los límites del territorio nacional, deberá cumplir con lo establecido en la Constitución y en la normativa ambiental vigente.”

Art. 84, de la protección del ecosistema: “Las actividades mineras en todas sus fases, contarán con medidas de protección del ecosistema, sujetándose a lo previsto en la Constitución de la República del Ecuador y la normativa ambiental vigente.”

Art. 86, de los daños ambientales: “Para todos los efectos legales derivados de la aplicación de las disposiciones del presente artículo y de la normativa ambiental vigente, la autoridad legal es el Ministerio del Ambiente.”

1.1.3. Límites de Descarga a un cuerpo de agua dulce

En el Acuerdo Ministerial 028, Quito, viernes 13 de febrero de 2015, se realizó la actualización del Libro VI del TULSMA, en el cual consta la Tabla 10 del Anexo 1 donde se establecen los siguientes límites de descarga a un cuerpo de agua dulce:

Tabla 1-1 Límites de descarga a un cuerpo de agua dulce.

TABLA 10. Límites de descarga a un cuerpo de agua dulce				
Parámetros		Expresado como	Unidad	Límite máximo permisible
Aceites y Grasas		Sust. solubles en hexano	mg/l	30,0
Aliq. mercurio			mg/l	No detectable
Aluminio		Al	mg/l	5,0
Arsénico total		As	mg/l	0,1
Bario		Ba	mg/l	2,0
Boro Total		B	mg/l	2,0
Cadmio		Cd	mg/l	0,02
Cianuro total		CN	mg/l	0,1
Cinc		Zn	mg/l	5,0
Cloro Activo		Cl	mg/l	0,5
Cloroformo		Est. carbón cloroformo ECC	mg/l	0,1
Cloruros		Cl	mg/l	1 000
Cobre		Cu	mg/l	1,0
Cobalto		Co	mg/l	0,5
Coliformes Fecales		NMP	NMP/100 ml	10000
Color real ¹		Color real	unidades de color	Inapreciable en dilución: 1/20
Compuestos fenólicos		Fenol	mg/l	0,2
Cromo hexavalente		Cr ⁶⁺	mg/l	0,5
Demanda Bioquímica de Oxígeno (5 días)		DBO ₅	mg/l	100
Demanda Química de Oxígeno		DQO	mg/l	200
Estaño		Sn	mg/l	5,0
Fluoruros		F	mg/l	5,0
Fósforo Total		P	mg/l	10,0
Hierro total		Fe	mg/l	10,0
Hidrocarburos Totales de Petróleo		TPH	mg/l	20,0
Manganeso total		Mn	mg/l	2,0
Materia flotante		Visibles		Ausencia
Mercurio total		Hg	mg/l	0,005
Níquel		Ni	mg/l	2,0
Nitrógeno amoniacal		N	mg/l	30,0
Nitrógeno Total Kjeldahl		N	mg/l	50,0
Compuestos Organoclorados		Organoclorados totales	mg/l	0,05
Compuestos Organofosforados		Organofosforados totales	mg/l	0,1
Plata		Ag	mg/l	0,1
Plomo		Pb	mg/l	0,2
Potencial de hidrógeno		pH		6-9
Selenio		Se	mg/l	0,1
Sólidos Suspendedos Totales		SST	mg/l	130
Sólidos totales		ST	mg/l	1 600
Sulfatos		SO ₄ ⁻²	mg/l	1000
Sulfuros		S ⁻²	mg/l	0,5
Temperatura		°C		Condición natural ± 3
Tensoactivos		Activas al azul de metileno	mg/l	0,5
Tetracloruro de carbono		Tetracloruro de carbono	mg/l	1,0

Fuente: (Texto Unificado de Legislación Secundario, 2015, <http://ecuadorforestal.org/>).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Metodología de la investigación

La presente investigación se realizó aplicando el método aplicativo y se complementó con el explicativo.

2.2. Diseño de la investigación

Se aplicó un diseño experimental puro ya que se manipuló directamente las variables y se analizó la relación entre ellas para obtener información necesaria.

2.3. Etapas de la investigación

La investigación se llevó a cabo en cinco etapas.

2.3.1. Primera etapa: Caracterización de relaves mineros de MINEREICIS S.A.

- Para recolectar las muestras de los ensayos, se utilizó frascos de 1 y 3,78L previamente lavados y enjuagados 3 veces con las muestras. Para su traslado a la ciudad de Riobamba, se mantuvieron en un cooler y se transportaron inmediatamente luego de ser recolectadas.
- Para el análisis físico, químico y biológico de las muestras se usó frascos limpios de 1000, 500 y 100mL, e igualmente fueron enjuagados 3 veces con el agua del muestreo. Una vez tomadas las muestras fueron enviadas inmediatamente dentro de un cooler al laboratorio Gruntec en la ciudad de Quito para los respectivos análisis.

2.3.2. Segunda etapa: Aislamiento de cepas bacterianas.

Para el aislamiento de bacterias de los relaves mineros se utilizó cuatro medios de cultivo distintos, en los cuales se determinó la carga bacteriana de 3 muestras diferentes incubadas a 3 temperaturas durante 24h.

MEDIOS DE CULTIVO

Para los cuatro medios de cultivo se utilizó OGYE como agar base. OGYE Agar Bacto tiene una composición por litro de:

- Extracto de levadura 5g
- Dextrosa 20g
- Agar 12g

PREPARACIÓN DE MEDIOS

OGYE

- Se diluyó 9,25g de OGYE en 250mL de agua destilada.
- Se llevó a hervir y se autoclavó durante 15min a 121°C
- Se distribuyó en cajas Petri.

OGYE + NaAsO₂ 0,1mM

- Se diluyó 9,25g de OGYE en 250mL de agua destilada.
- Se llevó a hervir y se autoclavó durante 15min a 121°C.
- Se preparó una solución de NaAsO₂ 0,1mM colocando 0,0026g de NaAsO₂ en 200mL de agua destilada.
- Se colocó NaAsO₂ 0,1mM en OGYE en una relación de 1% y se distribuyó el medio en cajas Petri.

R=OGYE con agua de relaves

- Se diluyó 9,25g de OGYE en 250mL de agua de los relaves mineros de la compañía MINEREICIS S.A.
- Se llevó a hervir y se autoclavó durante 15min a 121°C.
- Se distribuyó en cajas Petri.

L=OGYE con agua de la laguna

- Se diluyó 9,25g de OGYE en 250mL de agua de la laguna de la compañía SOMILOR S.A.
- Se procedió a hervir y se autoclavó durante 15min a 121°C.
- Se distribuyó en cajas Petri.

MUESTRAS EVALUADAS

Las muestras evaluadas fueron las siguientes:

- M1= Muestra líquida de la laguna
- M2= muestra líquida de relaves
- M3= Muestra sólida de relaves

TEMPERATURAS EVALUADAS

Las temperaturas evaluadas fueron:

- Temperatura ambiental
- 30°C
- 35°C.

La temperatura ambiente a cual se hace referencia en la presente investigación corresponde a 14°C, promedio de temperaturas en la ciudad de Riobamba durante los meses que se llevó a cabo la investigación, Anexo 4.

AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE CEPAS BACTERIANAS

- En cada medio se inoculó 50 µL de tres muestras: M1= Muestra líquida de la laguna, M2= muestra líquida de relaves y M3= Muestra sólida de relaves.
- Se probaron los distintos medios sembrados a tres temperaturas diferentes: temperatura ambiental; 30°C, y; 35°C.
- Se observó el desarrollo bacteriano.
- Se realizó el conteo de las UFC después de 24h.

- Se aisló cepas de los medios incubados a 30°C y a temperatura ambiente.
- Se repicó 3 veces las cepas aisladas, en cajas con OGYE + NaAsO₂ 1mM y se las mantuvo a temperatura ambiente durante 24h, hasta conseguir clones estabilizados.

2.3.3. Tercera etapa: Evaluación de resistencia a altas concentraciones de arsénico.

En esta etapa se repicaron las bacterias seleccionadas en medios preparados con OGYE a los cuales se le aumentó progresivamente concentraciones de arsenito y arsenato. Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente durante el tiempo necesario hasta obtener un tamaño significativo de cada cepa.

- Los clones estabilizados fueron repicados en OGYE + NaAsO₂ 5mM y en OGYE + Na₂HAsO₄ 5mM, y se mantuvieron a temperatura ambiente.
- Posteriormente los clones fueron repicados en OGYE + NaAsO₂ 10mM y en OGYE + Na₂HAsO₄ 10mM, se los mantuvo a temperatura ambiente.
- Los mismos clones se repicaron en OGYE + NaAsO₂ 15mM y en OGYE + Na₂HAsO₄ 15mM, se los mantuvo a temperatura ambiente.
- Nuevamente se repicaron los clones en OGYE + NaAsO₂ 20mM y en OGYE + Na₂HAsO₄ 20mM, se los mantuvo a temperatura ambiente.
- Finalmente se repicó los clones más resistentes en OGYE + NaAsO₂ 30mM y en OGYE + Na₂HAsO₄ 30mM, y se los mantuvo a temperatura ambiente.

2.3.4. Cuarta etapa: Prueba de oxidación/ reducción de arsénico.

Las pruebas de oxidación / reducción de arsénico se realizaron en base a la metodología descrita por Simeonova *et al.* (2004), en el trabajo “Microplate screening assay for the detection of arsenite-oxidizing and arsenate-reducing bacteria”. Este método tiene varias ventajas: es económico, es fácil, no necesita equipos sofisticados, se puede realizar en corto tiempo y para un gran número de

cepas. Lo cual constituye una solución para evaluar el arsénico en el ambiente y su interacción con las bacterias.

- Simeonova *et al.* (2004) usaron en su investigación Tris-Cl buffer para suspender las bacterias, pero en nuestro caso se usó agua de peptona. El agua de peptona se preparó con agua destilada, de acuerdo a las instrucciones del proveedor.
- Se distribuyó 8mL de agua de peptona en tubos de ensayo previamente lavados y esterilizados.
- En cada tubo se sembró una muestra de cada cepa utilizando un asa estéril.
- Se incubó los tubos a temperatura ambiente durante 72h.
- Finalizado el tiempo de incubación, se midió la absorbancia de cada tubo.
- Se centrifugó los tubos a 3000rpm durante 15min y se retiró el sobrenadante.
- Se lavó el pellet con agua desionizada estéril.
- Se resuspendió el pellet en 2mL de agua desionizada estéril.
- Simeonova *et al.* (2004) expresaron en su estudio que la intensidad de color incrementa de acuerdo a la concentración de arsénico y los mejores resultados fueron apreciados a concentraciones de 0,67mM de arsenito y arsenato. En nuestro caso se decidió usar concentraciones de 1mM y 5mM de arsenito y arsenato para apreciar las variaciones de color. Se preparó soluciones de agua peptonada con concentraciones de 1mM y 5mM de arsenito y arsenato.
- Se colocó 200µL de cada solución en tubos de ensayo previamente lavados y esterilizados.
- Se inoculó 100µL de cada cepa resuspendida, excepto en los tubos para control.
- Simeonova *et al.* (2004) aplicaron un tiempo de 3 días de incubación para las cepas. Mientras que en nuestra investigación las cepas fueron incubadas durante 5 y 10 días a temperatura ambiente (19°C) para obtener una mayor concentración bacteriana.
- Terminado el tiempo de incubación, se colocó 200µL de una solución de AgNO₃ 0,2M, preparada al momento de su uso, en cada tubo de ensayo.
- Se observó el cambio de color en cada tubo.

2.3.5. Quinta etapa: *Identificación de las cepas bacterianas aisladas de relaves mineros.*

La caracterización de las cepas bacterianas se realizó aplicando las pruebas:

- Tinción de Gram
- Oxidasa
- Catalasa
- Pruebas bioquímicas MICROGEN MID 64, MID 65. GnB y GnA.

Las pruebas bioquímicas incluyeron los siguientes análisis:

- | | |
|---|-------------|
| - Nitrato | - Gelatina |
| - Lisina | - Malonato |
| - Ornitina | - Inositol |
| - H ₂ S | - Sorbitol |
| - Glucosa | - Ramnosa |
| - Manitol | - Sacarosa |
| - Xilosa | - Lactosa |
| - ONPG (orto-nitrofenilgalactopiranosido) | - Arabinosa |
| - Indole | - Adonitol |
| - Urea | - Rafinosa |
| - V.P. (Voges-Proskauer) | - Salicina |
| - Citrato | - Arginina |
| - TDA (triptófano desaminasa) | |

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS, DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

3.1. Muestreo

Las muestras recolectadas para el estudio se obtuvieron de los relaves del campamento de la compañía minera MINEREICIS S.A, ubicado en el cantón Ponce Enríquez de la provincia del Azuay.



Figura 6-3 Piscina de relaves mineros.
Realizado por: (Anabell Duque, 2015)

También se recolectó una muestra de la laguna de tratamiento de relaves de la compañía minera SOMILOR S.A, lugar donde MINEREICIS S.A. deposita sus relaves para tratarlos adecuadamente de acuerdo a la ley, cumpliendo así con su responsabilidad ambiental. La compañía SOMILOR S.A. se encuentra ubicada en el cantón Ponce Enríquez de la provincia del Azuay.



Figura 7-3 Piscina de tratamiento de relaves mineros (Laguna).
Realizado por: (Anabell Duque, 2015)

3.2. Primera etapa: Caracterización de relaves mineros de MINEREICIS S.A.

En la Tabla 2-3, se indica la concentración de los principales metales pesados en los relaves. La caracterización total de los relaves se encuentra en el Anexo 1.

Tabla 2-3: Metales totales en relaves mineros.

Metales totales	Concentración en relaves mineros	Límite máximo permisibles Tabla 10 TULSMA	Método adaptado de referencia
Arsénico total	232 mg/L	0,1 mg/L	EPA 6020
Cadmio	0,54 mg/L	0,02 mg/L	EPA 6020
Hierro	6996 mg/L	10.0 mg/L	EPA 6020
Mercurio	0,025 mg/L	0,005 mg/L	EPA 6020
Plomo	22 mg/L	0,2 mg/L	EPA 6020
Manganeso	195 mg/L	2.0 mg/L	EPA 6020
Cobre	12 mg/L	1.0 mg/L	EPA 6020

Realizado por: (Anabell Duque, 2015)

El método EPA 6020 consiste en la aplicación de espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente.

De acuerdo a la concentración obtenida de arsénico en los relaves, se comprueba que dicho valor está muy alejado del límite máximo permisible por el TULSMA.

La alta concentración de arsénico en los relaves es producto de la perforación de la mina, debido a que geológicamente el suelo del lugar tiene una alta presencia natural del metal.

3.3. Segunda etapa: Aislamiento de cepas bacterianas.

Ecuación para el cálculo de UFC/mL

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{Nro\ de\ colonias\ por\ placa * factor\ de\ dilución}{mL\ de\ muestra\ sembrada}$$

Resultados obtenidos a las 24h.

Transcurridas las 24h de incubación, se procedió a realizar el conteo de las colonias de las muestras inoculadas en cada medio.

Para esta investigación no fue necesario realizar diluciones, ya que la carga bacteriana presente en las muestras sería baja debido a la composición de los relaves y el agua de la piscina.

Tabla 3-3: Crecimiento bacteriano en distintos medios a temperatura ambiente.

Muestra	Medio de cultivo			
	OGYE (UFC/mL)	OGYE +As0,1mM (UFC/mL)	OGYE+L (UFC/mL)	OGYE+R (UFC/mL)
M1	340	20	0	20
M2	0	20	60	80
M3	1060	2240	580	860

Realizado por: (Anabell Duque, 2015)

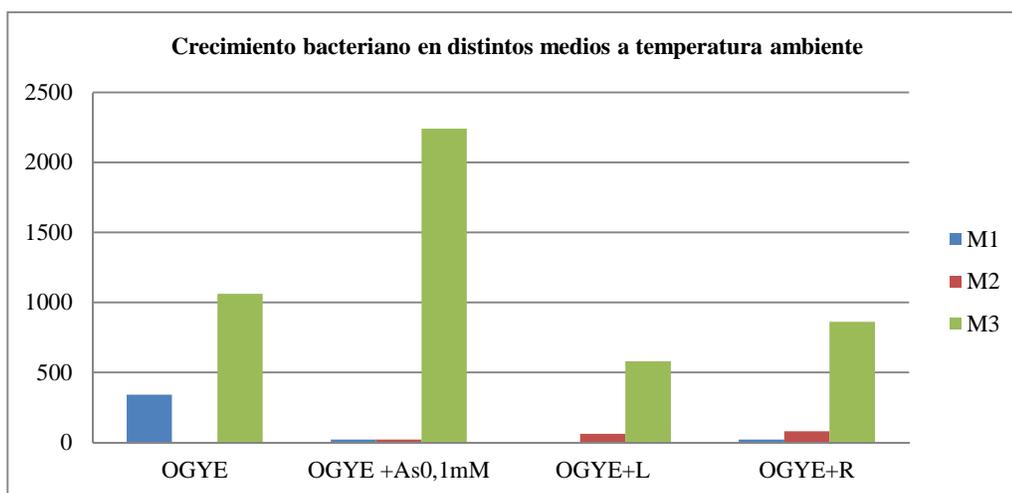


Figura 8-3: Crecimiento bacteriano en distintos medios a temperatura ambiente

Realizado por: (Anabell Duque, 2015)

De acuerdo a los resultados obtenidos a temperatura ambiente, se determinó que se obtuvo un mayor crecimiento en el medio suplementado con arsénico, específicamente para la muestra M3, lo que indica que el arsénico confiere alguna ventaja a las bacterias de la muestra sólida de relaves. Las bacterias de la muestra M3 tuvieron mayor crecimiento en los 4 medios, en comparación con M1 y M2.

La muestra M1 tuvo más UFC en el medio OGYE. Las bacterias de la muestra M2 presentaron el menor crecimiento en todos los medios.

Tabla 4-1: Crecimiento bacteriano en distintos medios a 30°C

Muestra	Medio de cultivo			
	OGYE (UFC/mL)	OGYE +As0,1mM (UFC/mL)	OGYE+L (UFC/mL)	OGYE+R (UFC/mL)
M1	300	520	2060	1960
M2	220	420	2800	2600
M3	4800	8200	9200	8480

Realizado por: (Anabell Duque, 2015)

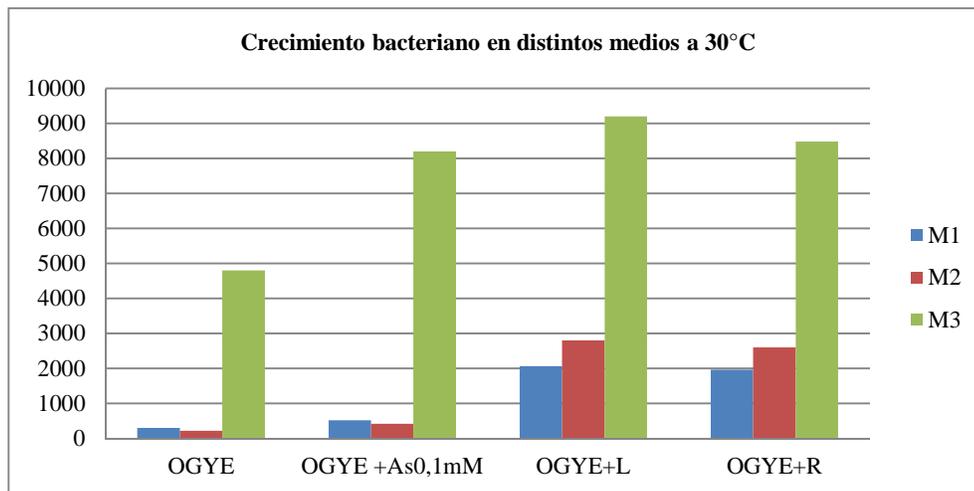


Figura 9-3: Crecimiento bacteriano en distintos medios a 30°C

Realizado por: (Anabell Duque, 2015)

En este caso, al igual que a temperatura ambiente las bacterias de la muestra M3 se desarrollaron mejor en los 4 medios. La mayor cantidad de UFC de M3 fue en el medio OGYE+L.

El aumento de temperatura favoreció el desarrollo de las bacterias de las 3 muestras. En esta prueba se pudo observar mejor el patrón de crecimiento. Las bacterias de las 3 muestras se adaptaron mejor a los medios preparados con agua de relaves y de la laguna. Esto se debe a que las bacterias provienen de dichos medios y es posible que estén adaptadas a altas concentraciones de arsénico. Además, el desarrollo de las bacterias mejoró debido a otros componentes presentes en los relaves y la laguna (Anexo 1).

Tabla 5-3: Crecimiento bacteriano en distintos medios a 35°C

Muestra	Medio de cultivo			
	OGYE (UFC/mL)	OGYE +As0,1mM (UFC/mL)	OGYE+L (UFC/mL)	OGYE+R (UFC/mL)
M1	2260	1060	3200	1320
M2	2400	4400	8400	660
M3	18360	38400	14400	12600

Realizado por: (Anabell Duque, 2015)

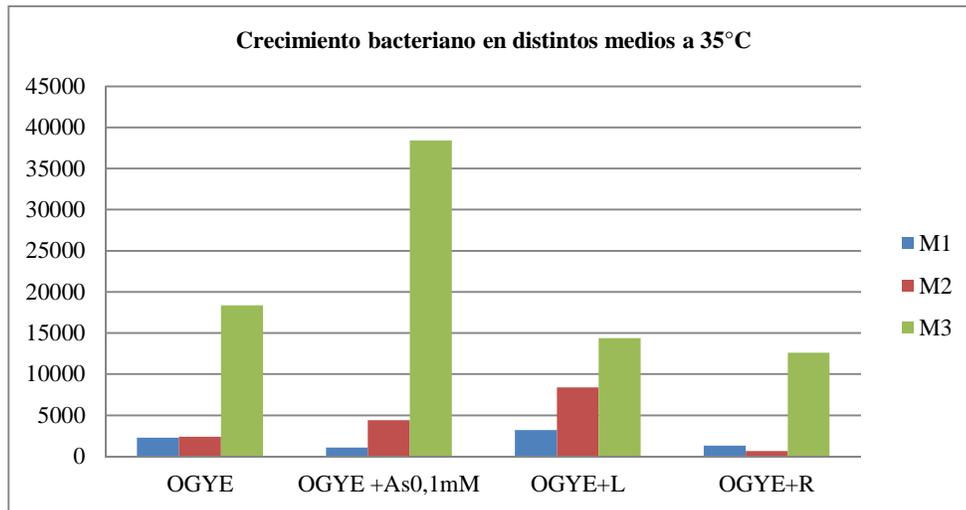


Figura 10-3: Crecimiento bacteriano en distintos medios a 35°C

Realizado por: (Anabell Duque, 2015)

De igual manera, a 35°C, M3 fue la muestra con mayor número de UFC, y aquí se evidencia claramente la preferencia de las cepas por el medio OGYE +As0,1mM.

Las bacterias de la muestra M1 se desarrollaron mejor en el medio OGYE+L, al igual que las de la muestra M2.

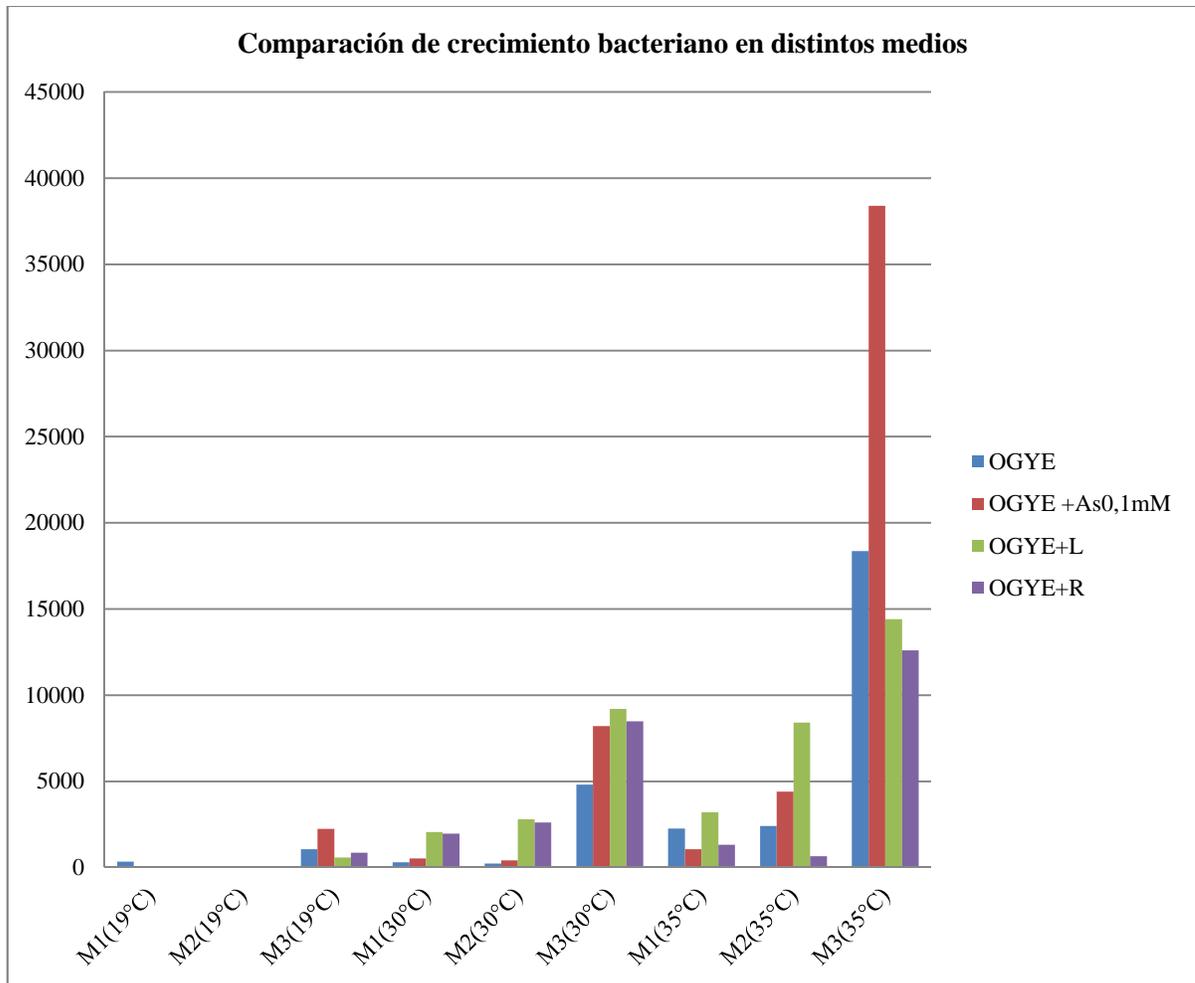


Figura 11-3: Comparación de crecimiento bacteriano en distintos medios.

Realizado por: (Anabell Duque, 2015)

En la Fig. 11-3 se puede apreciar que existe una importante influencia de la temperatura en el desarrollo de las cepas bacterianas aisladas. En las 3 temperaturas evaluadas el mayor crecimiento fue de las bacterias de la muestra M3. Farah *et al.* (2010) determinaron en su estudio “Isolation and Characterization of Arsenic Reducing Bacteria from Industrial Effluents and their Potential Use in Bioremediation of Wastewater”, que la temperatura óptima de crecimiento para las bacterias resistentes a arsénico fue 30°C para *Klebsiella oxytoca* y 37°C para *Citrobacter freundii* y *Bacillus anthracis*. En el presente estudio se obtuvo en general un mayor desarrollo bacteriano a 35°C, pero existieron excepciones como en el caso de M1 y M2 que presentaron más crecimiento a 30°C que a 35°C en el medio OGYE+R. Por lo tanto, la temperatura óptima de crecimiento puede variar de acuerdo al tipo de bacteria.

Se verificó una clara preferencia de las bacterias hacia los medios de cultivo que tenían arsénico, principalmente para el medio OGYE +As 0,1mM, por lo que se asume que el metaloide aporta algún tipo de ventaja para su crecimiento. También se puede apreciar que en los cultivos a 30°C y 35°C las bacterias se adaptaron mejor a los medios OGYE+R y OGYE+L, esto puede ser debido a la composición del agua de los relaves y de la laguna (Anexo 1), la presencia de otros compuestos puede favorecer su desarrollo.

Debido a que nos interesan las cepas resistentes a arsénico, se excluyó aquellas que crecieron en el medio 1, igualmente no se consideró las que crecieron a 35°C, ya que para pruebas posteriores se usará temperatura ambiente y el cambio de temperatura podría inhibir su desarrollo.

Por lo tanto, para los próximos ensayos, se seleccionó clones de los medios OGYE+As0,1 mM, OGYE+L y OGYE+R que se desarrollaron a 30°C y a temperatura ambiente (19°C).



Figura 12-3: Crecimiento de bacterias de la muestra M2 en diferentes medios a 30°C.
Realizado por: (Anabell Duque, 2015)

En la Fig. 12-3 se observa el crecimiento de bacterias de la muestra M2 en los 4 medios evaluados a 30°C. Claramente se verifica que las cepas crecieron mejor en los medios que contenían arsénico, el desarrollo fue incluso mayor en OGYE+L y OGYE+R, por lo tanto se asume que las bacterias no únicamente resisten a altas concentraciones de arsénico, sino también de otros metales pesados como los especificados en la tabla 2-3.

3.4. Tercera etapa: Evaluación de resistencia a altas concentraciones de arsénico.

De los microorganismos aislados, se seleccionaron un total de 47 clones para evaluar su resistencia a arsenito y arsenato, de las cuales 21 pertenecían al grupo que se aisló a temperatura ambiente, y 26 del grupo aislado a 30°C. Todas las pruebas de resistencia se realizaron a temperatura ambiente.

Para empezar a probar las cepas en altas concentraciones de arsénico, se realizó primero una estabilización de los clones mediante tres repiques consecutivos en un medio de cultivo preparado con OGYE + NaAsO₂ 1mM.

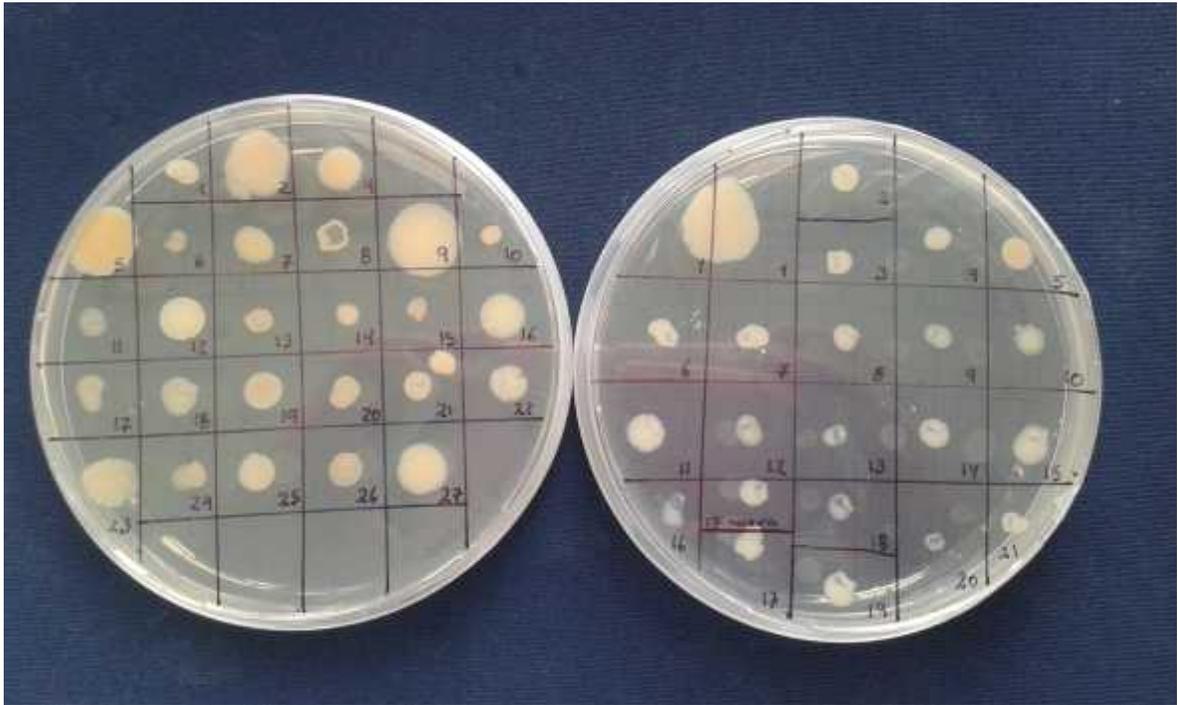
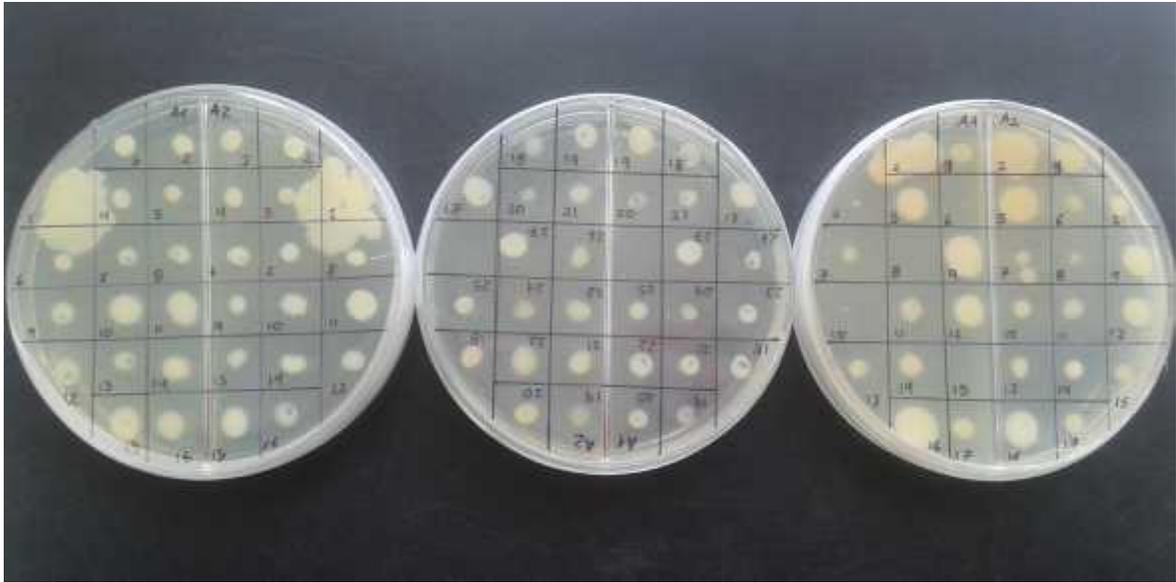


Figura 13-3: Apariencia de los clones estabilizados en OGYE + NaAsO₂ 1mM después de 24h de incubación a temperatura ambiente.

Realizado por: (Anabell Duque, 2015)



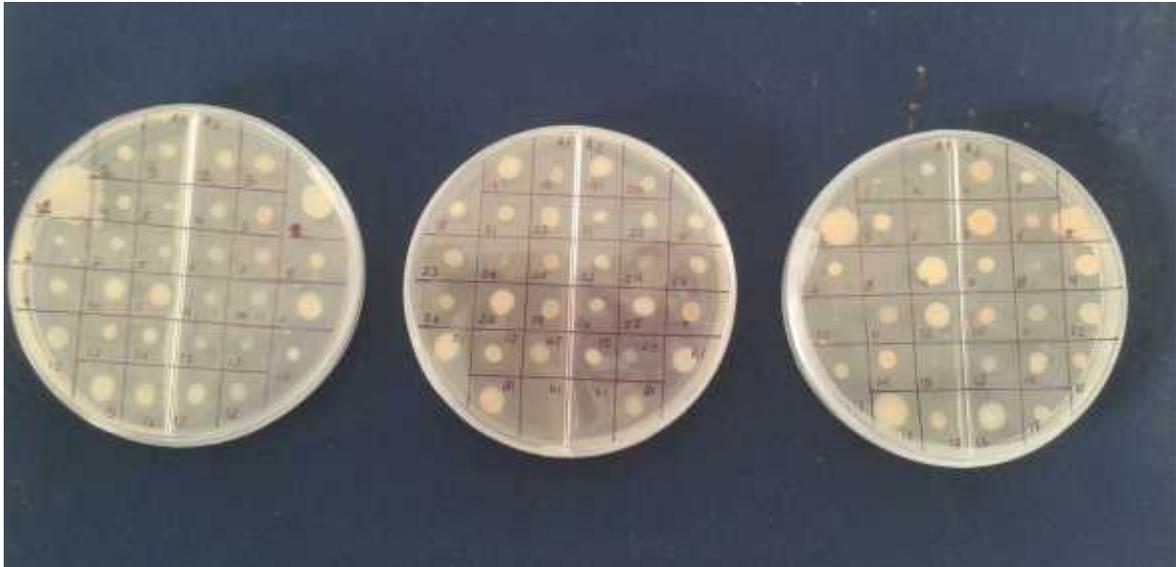
A1 = arsenito; A2 = arsenato.

Figura 14-3: Cepas resistentes a concentraciones de 5mM de arsenito y 5mM de arsenato.

Realizado por: (Anabell Duque, 2015)

En la Fig. 14-3 se observa, en la caja de la izquierda las cepas aisladas a temperatura ambiente, en la caja de la derecha se muestra las cepas aisladas a 30°C y en la caja central, las dos filas superiores corresponden a bacterias aisladas a temperatura ambiente, y las filas siguientes son cepas aisladas a 30°C.

En este primer ensayo fue necesario un tiempo de incubación de 48h a temperatura ambiente para observar el crecimiento de las cepas bacterianas. De acuerdo a los resultados, fue evidente que algunas cepas tuvieron un mejor desarrollo, es el caso de la cepa 1 aislada a temperatura ambiente, y las cepas 2, 3, 5, 9, 12 y 16 aisladas a 30°C.



A1 = arsenito; A2 = arsenato.

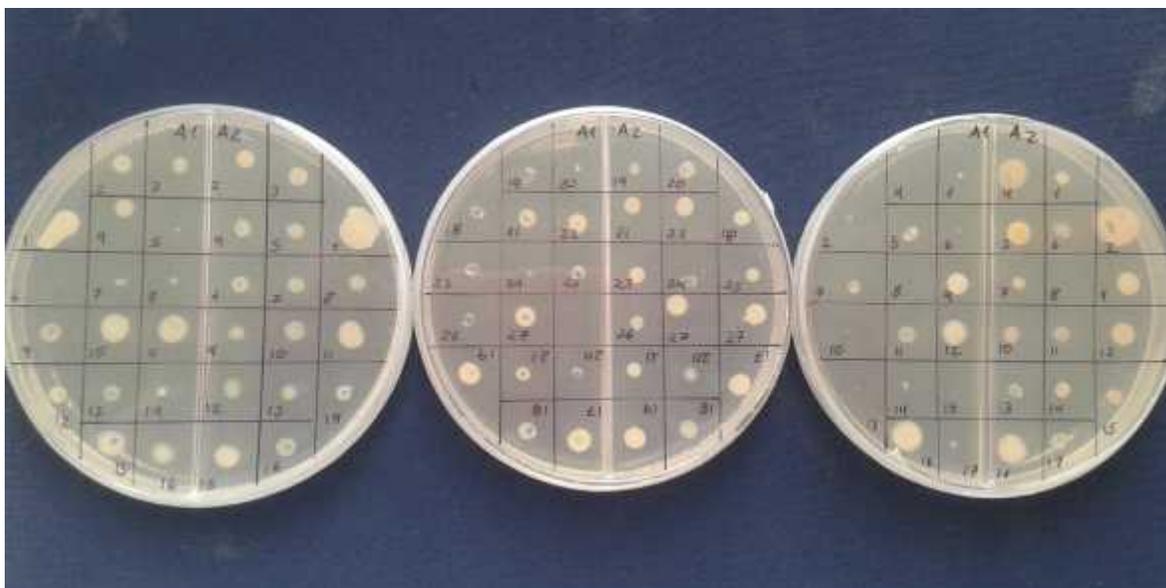
Figura 15-3: Cepas resistentes a concentraciones de 10mM de arsenito y 10mM de arsenato.

Realizado por: (Anabell Duque, 2015)

Al obtener un crecimiento satisfactorio a 5mM, todas las cepas anteriores fueron repicadas en el medio OGYE con concentraciones de 10mM de arsenito y 10mM de arsenato, de igual manera se las incubó durante 48h a temperatura ambiente.

En la Fig. 15-3 se observa, en la caja de la izquierda las cepas aisladas a temperatura ambiente, en la caja de la derecha se muestra las cepas aisladas a 30°C y en la caja central, las cuatro filas superiores corresponden a bacterias aisladas a 30°C, y las dos filas siguientes son cepas aisladas a temperatura ambiente.

En este caso el crecimiento se observó más limitado pasadas las 48h, pero el patrón de crecimiento se mantiene, es decir, se observó un mayor desarrollo en la cepa 1 aislada a temperatura ambiente, y en las cepas 2, 3, 5, 9, 12 y 16 aisladas a 30°C.



A1 = arsenito; A2 = arsenato.

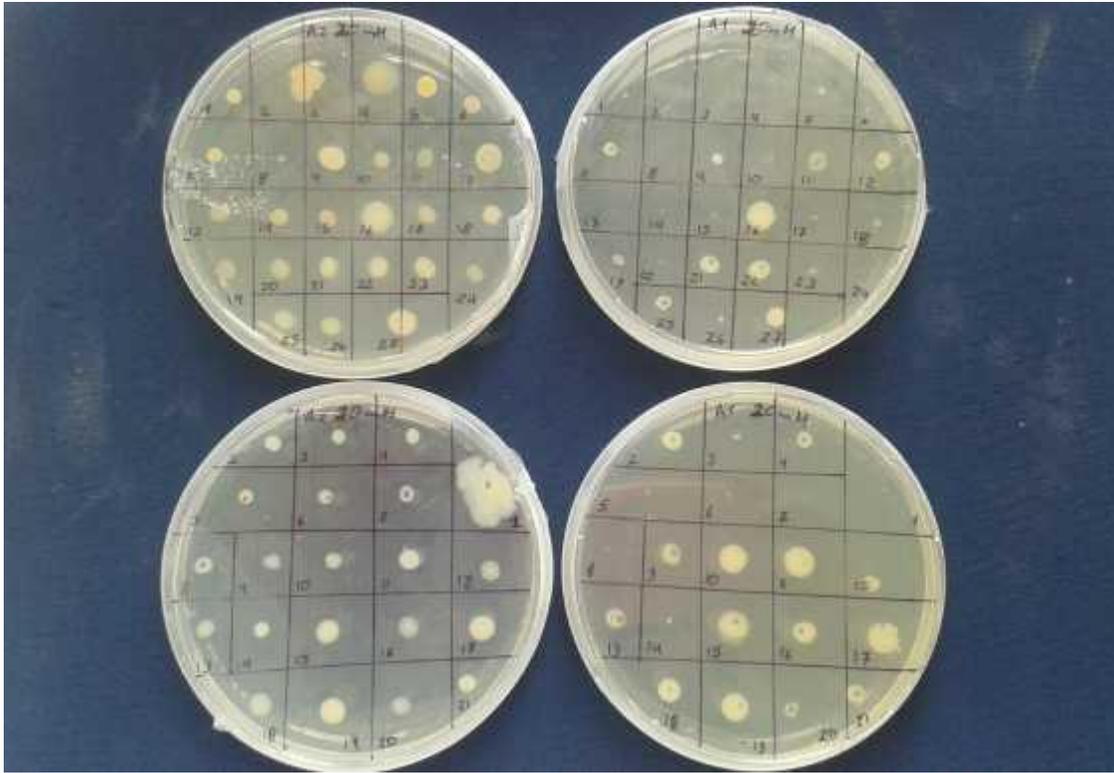
Figura 16-3: Cepas resistentes a concentraciones de 15mM de arsenito y 15mM de arsenato

Realizado por: (Anabell Duque, 2015)

En la Fig. 16-3 se observa, en la caja de la izquierda las cepas aisladas a temperatura ambiente, en la caja de la derecha se muestra las cepas aisladas a 30°C y en la caja central, las dos filas superiores corresponden a bacterias aisladas a temperatura ambiente, y las filas siguientes son cepas aisladas a 30°C.

Se repicaron todas las cepas aisladas en las concentraciones de 15mM de arsenito y 15mM de arsenato. El tiempo de incubación fue de 48h a temperatura ambiente. Se observó que el arsénico inhibió parcialmente el crecimiento de algunos clones y total de otros.

En este caso fue más evidente que el arsenito afecta más el desarrollo de las bacterias en comparación con el arsenato. Las cepas 5, 6 y 20 aisladas a temperatura ambiente, crecieron menos en arsenito que en arsenato. Y de igual forma sucedió con las cepas 1, 2, 4, 10, 13, 15 y 17 aisladas a 30°C. Además, la cepa 8 aislada a 30°C no creció en ninguno de los medios.



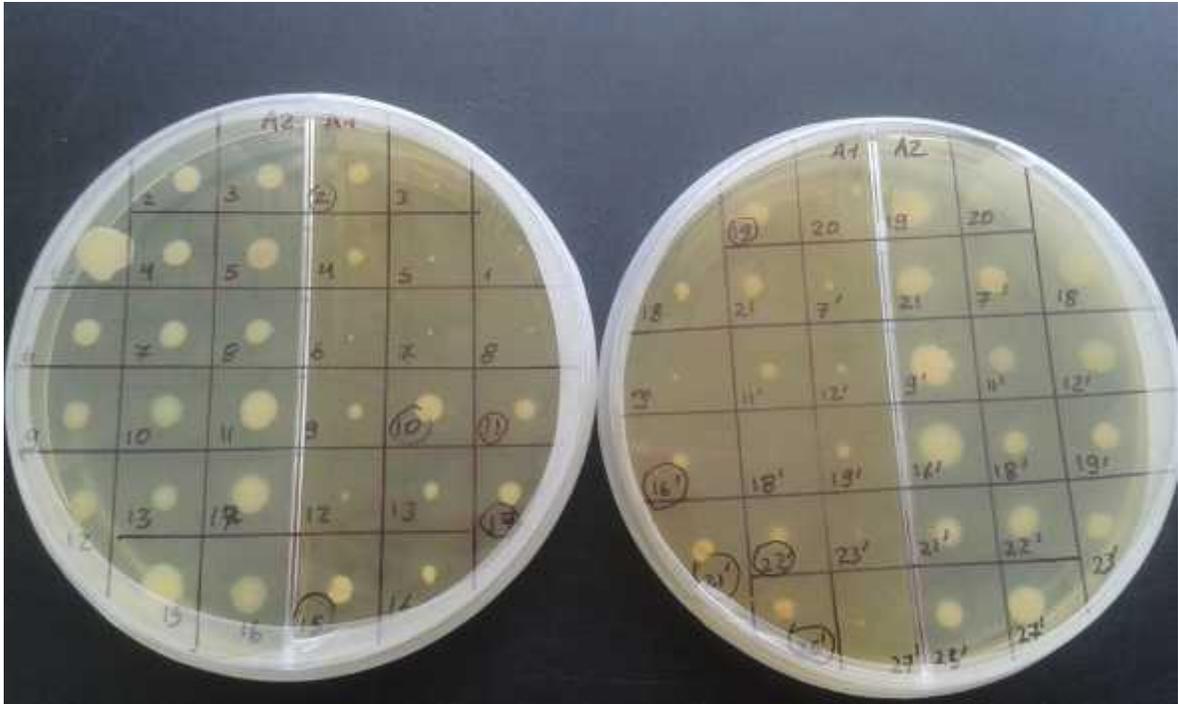
A1 = arsenito; A2 = arsenato.

Figura 17-3: Cepas resistentes a concentraciones de 20mM de arsenito y 20mM de arsenato

Realizado por: (Anabell Duque, 2015)

A concentraciones de 20mM de arsenito y 20mM de arsenato, se comprobó la inhibición de algunas cepas bacterianas. Para estas concentraciones fue necesario un tiempo de incubación de 96h a temperatura ambiente para que los clones tengan tamaños equivalentes con los ensayos anteriores.

En la Fig. 17-3, se puede observar en las dos cajas superiores las bacterias aisladas a 30°C, de las cuales únicamente las cepas 7, 9, 11, 12, 16, 21, 22, 25 y 27 tuvieron un desarrollo satisfactorio en los dos medios, las demás fueron inhibidas en Arsenito. Mientras que las cajas inferiores muestran las bacterias aisladas a temperatura ambiente, de las cuales las cepas 1, 5, 6, 7, 8 y 14 fueron inhibidas en arsenito, las demás se desarrollaron satisfactoriamente en los dos medios.



A1 = arsenito; A2 = arsenato.

Figura 18-3: Cepas resistentes a concentraciones de 30mM de arsenito y 30mM de arsenato
Realizado por: (Anabell Duque, 2015)

Debido a que en las pruebas anteriores se produjo la inhibición de algunas cepas bacterianas, para la prueba de resistencia a 30mM de arsenito y arsenato, sólo se repicaron las cepas que se han desarrollado satisfactoriamente durante todo el ensayo. De igual manera para este ensayo fue necesario un tiempo de incubación de 96h a temperatura ambiente para observar claramente los clones.

En la Fig. 18-3, se observa en la caja de la izquierda, las cepas bacterianas aisladas a temperatura ambiente, y en la caja de la derecha, las cepas aisladas a 30°C.

En esta última prueba, se puede observar mejor la inhibición de crecimiento en arsenito, es el caso de las cepas 1, 3, 5, 6, 7, 8 y 12 aisladas a temperatura ambiente, y las cepas 7, 9, 12, 18, 23 y 27 aisladas a 30°C.

Tabla 6-3: Pruebas de Resistencia a arsénico. Cepas aisladas a temperatura ambiente.

Medio de cultivo : OGYE Agar Bacto											
		48h de incubación		48h de incubación		48h de incubación		96h de incubación		96h de incubación	
Origen	N°	Arsenito 5mM	Arsenato 5mM	Arsenito 10mM	Arsenato 10mM	Arsenito 15mM	Arsenato 15mM	Arsenito 20mM	Arsenato 20mM	Arsenito 30mM	Arsenato 30mM
M1-2	1	+++	+++	++	+++	++	+++	-	+++	-	+++
M1-R	2	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
M2-2	3	++	++	++	++	++	++	+	++	-	++
M2-L	4	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++
	5	+	++	+	++	+	++	-	++	-	++
M2-R	6	++	++	+	++	+	++	-	++	-	++
	7	++	++	++	++	+	++	-	++	-	++
	8	++	++	++	++	+	++	-	++	-	++
M3-2	9	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++
	10	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
	11	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
	12	++	++	++	++	++	++	++	++	-	++
	13	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
M3-L	14	++	++	++	++	++	++	-	++		
	15	+++	+++	+++	+++	++	++	+	++	++	++
	16	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	++
	18	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	++
M3-R	17	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	++
	19	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	++	++
	20	++	++	++	++	++	++	++	++	-	++
	21	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++

(+++) grande; (++) mediana; (+) pequeña; (-) nulo crecimiento; celdas en blanco indican que no se realizó repique de las cepas.

Realizado por: (Anabell Duque, 2015).

Tabla 7-3: Pruebas de Resistencia a arsénico. Cepas aisladas a 30°C.

Medio de cultivo : OGYE Agar Bacto											
		48h de incubación		48h de incubación		48h de incubación		96h de incubación		96h de incubación	
Origen	N°	Arsenito 5mM	Arsenato 5mM	Arsenito 10mM	Arsenato 10mM	Arsenito 15mM	Arsenato 15mM	Arsenito 20mM	Arsenato 20mM	Arsenito 30mM	Arsenato 30mM
M1-2	1	+	++	+	++	+	pequeña	-	Pequeña		
	2	+++	+++	+++	+++	+	+++	-	+++		
	4	++	++	+	++	+	++	-	++		
M1-R	5	+++	+++	+	++	+	++	-	++		
	6	+	++	+	++	+	++	-	++		
	7	++	++	++	++	++	++	++	++	-	++
	8	+	++	-	+	-	-	-	-		
M1-L	9	++	++	++	++	++	++	++	++	-	++
	10	+	++	+	++	+	++	-	++		
M2-2	11	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++
	12	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	-	++
M2-L	13	++	++	++	++	+	++	-	++		
M2-R	14	++	++	++	++	+	++	-	++		
	15	+	++	+	++	+	++	-	++		
M3-2	16	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	++
	17	++	++	++	++	+	++	-	++		
	18	++	++	++	++	++	++	+	++	+	++
	19	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++
	20	++	++	++	++	+	++	-	++		
	21	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
M3-L	22	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	23	++	++	++	++	++	++	+	++	-	++
	24	++	++	+	++	+	++	-	++		
M3-R	25	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
	26	++	++	++	++	++	++	-	++		
	27	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	-	++

(+++) grande; (++) mediana; (+) pequeña; (-) nulo crecimiento; celdas en blanco indican que no se realizó repique de las cepas.

Realizado por: (Anabell Duque, 2015).

Al finalizar las pruebas de resistencia, se ha demostrado que las bacterias tienen un mejor desarrollo en arsenato que en arsenito, incluso en altas concentraciones. Este resultado coincide con el hecho de que el arsenito es más tóxico que el arsenato para todo tipo de organismo, según la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. (2014)

Las bacterias aisladas inicialmente a temperatura ambiente soportaron mejor las altas concentraciones de arsénico en comparación con las cepas aisladas a 30°C.

La resistencia nos indicó que son bacterias extremotolerantes que pueden vivir en concentraciones de arsénico mayores a las que se encuentran en los relaves. En estudios anteriores se demostró que cepas bacterianas de *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Escherichia*, entre otros (Campos *et al.* 2007 p. 154; Mellado *et al.* 2008 p. 118), fueron capaces de resistir concentraciones mayores a 8mM de arsénico, pero en este trabajo se aislaron cepas capaces de crecer en concentraciones de hasta 30mM. Lo que nos indica que las cepas están adaptadas a altas concentraciones del metaloide en su medio natural.

3.5. Cuarta Etapa: Pruebas de oxidación / reducción de arsénico

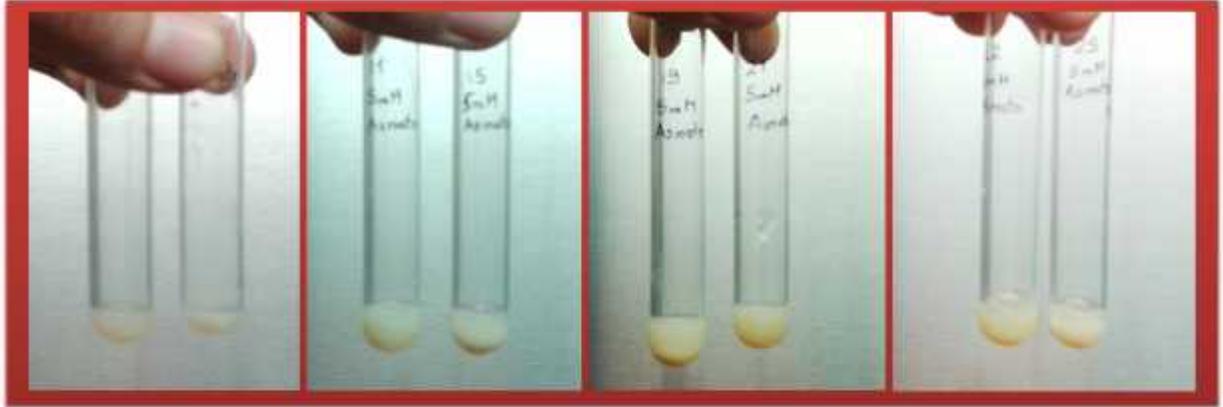


Figura 19-3: Tubos de control de pruebas de oxidación /reducción de arsénico.
Realizado por: (Anabell Duque, 2015)

En la Fig. 19-3, se puede observar los controles para las pruebas. El tubo de la izquierda, con una solución de arsenito 5mM y nitrato de plata 0,2M, forma un precipitado de color amarillo. Mientras que el tubo de la derecha con arsenato 5mM y nitrato de plata 0,2M, forma un precipitado de color marrón.

Se realizó una primera prueba con 8 clones, para la selección de los clones se consideró aquellas bacterias que presentaron un desarrollo continuo durante los ensayos de resistencia y crecieron tanto en arsenito como arsenato a concentraciones de 30mM. Las cepas seleccionadas fueron: 2, 5, 11, 15 y 19 del grupo aislado a temperatura ambiente; y las cepas 21, 22 y 25 del grupo aislado a 30°C.

Las pruebas se llevaron a cabo a temperatura ambiente con concentraciones de 1mM y 5mM de arsenito y arsenato, en tiempos de incubación de 5 y 10 días. Al finalizar los días de incubación, se obtuvo un color amarillo para todas las pruebas.



Orden de las cepas de izquierda a derecha: 2, 5, 11, 15, 19, 21, 22 y 25.

Figura 20-3: Prueba de oxidación/reducción de arsénico. Arsenato 5mM.

Realizado por: (Anabell Duque, 2015).

En la Fig. 20-3, se puede observar los resultados de los tubos con arsenato 5mM después de 5 días.

El color amarillo indica que las cepas redujeron el arsenato a arsenito.



Orden de las cepas de izquierda a derecha: 2, 5, 11, 15, 19, 21, 22 y 25.

Figura 20-3: Prueba de oxidación/reducción de arsénico. Arsenito 5mM.

Realizado por: (Anabell Duque, 2015).

En la Fig. 21-3, se puede observar los tubos con arsenito 5mM después de 5 días. El color amarillo

indica que las bacterias no actuaron sobre el arsenito.

Posteriormente se realizó la misma prueba con otras 10 cepas bacterianas, para la selección de las nuevas cepas se consideró aquellas que resistieron concentraciones de 20mM de arsenito y arsenato. Las cepas seleccionadas fueron: 1, 5, 16 y 18 aisladas a temperatura ambiente; y las cepas 2, 5, 9, 15, 16 y 26 del grupo de bacterias aisladas a 30°C.



Orden de las cepas de izquierda a derecha: 1, 5, 16 y 18 (T amb.); 2, 5, 9, 15, 16 y 26 (30°C)
Figura 22-3: Prueba de oxidación/reducción de arsénico. Arsenato y Arsenito 5mM.
Realizado por: (Anabell Duque, 2015).

En la Fig. 22-3 se observa en la fila superior las cepas en peptona con arsenato 5mM después de 5 días, y en la fila inferior las mismas cepas en agua de peptona con arsenito a 5mM. Los resultados para estas nuevas cepas fueron similares, tanto a los 5 como a los 10 días. Todas formaron un precipitado amarillo, por lo tanto las bacterias fueron capaces de transformar el arsenato en arsenito.

Mediante estas pruebas se constató que transcurridos los 5 días, todas las cepas fueron capaces de reducir el arsenato a arsenito.

El arsenato es un compuesto más estable en aguas superficiales y en presencia de oxígeno, en comparación con el arsenito, por lo tanto, existen un mayor número de microorganismo adaptados a este compuesto. La reducción del arsenato constituye un importante proceso de detoxificación (Mellado *et al.* 2008 p. 118). Esto explicaría la razón de que todas las cepas evaluadas en el presente trabajo, fueron capaces de reducir el arsenato.

En los sistemas unicelulares el arsenato se moviliza a través del transportador de fosfato. La reducción de arsénico por microorganismos se debe a la presencia del gen *ars*, este gen puede estar presente en plásmidos o en el cromosoma. (Castillo F., 2005, p.240). Por lo tanto, se podría asumir que las bacterias aisladas durante esta investigación, presentan dicho gen.

3.6. Quinta etapa: Identificación de las cepas bacterianas aisladas de relaves mineros.

Para la identificación se consideró las 8 cepas resistentes a concentraciones de 30mM de arsenato y arsenito.

Tabla 8-3: Identificación de las cepas bacterianas aisladas de relaves mineros.

Aisladas a Temperatura ambiente			
Origen	N°	Tinción Gram	Género
M1-2	1	bacilos (-)	<i>Pseudomonas sp.</i>
M3-2	10	bacilos (-)	<i>Pseudomonas sp.</i>
M3-2	11	bacilos (-)	<i>Pseudomonas sp.</i>
M3-L	15	bacilos (-)	<i>Vibrio sp.</i>
M3-R	19	bacilos (-)	<i>Pseudomonas sp.</i>
Aisladas a 30°C			
Origen	N°	Tinción Gram	Género
M3-2	21	bacilos (-)	<i>Pseudomonas sp.</i>
M3-L	22	bacilos (-)	<i>Pseudomonas sp.</i>
M3-R	25	bacilos (-)	<i>Pasteurella sp.</i>

Realizado por: (Anabell Duque, 2015).

La capacidad de reducción de arsénico ha sido reportada en varios géneros de bacterias incluyendo *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Escherichia*, entre otros (Campos *et al.* 2007 p. 154; Mellado *et al.* 2008 p. 118). En este trabajo se aislaron cepas correspondientes a los géneros *Pseudomonas*, *Vibrio* y *Pasteurella* capaces de crecer en elevadas concentraciones de arsénico y de reducirlo a arsenito.

CONCLUSIONES

Se caracterizó físico, química y microbiológicamente los relaves mineros de la compañía MINEREICIS, y se encontró que existe una alta presencia de arsénico, por lo tanto este metal ejerce un una presión selectiva que resultó favorable para la investigación.

Se aislaron bacterias de relaves mineros y se evaluó su resistencia a arsénico utilizando como medio base OGYE con concentraciones crecientes del metaloide. Finalmente se obtuvo 8 cepas que se desarrollaron hasta en concentraciones de 30mM de arsenito y arsenato.

Se evaluó, a nivel de laboratorio, la capacidad de reducir u oxidar el arsénico en las cepas bacterianas aisladas, utilizando un método de detección cualitativo con nitrato de plata, mediante el cual se obtuvo resultados positivos para la reducción de arsenato a arsenito en todas las cepas evaluadas.

Se identificaron 8 cepas bacterianas resistentes a 30 mM de arsénico y se determinó que estas bacterias pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Vibrio* y *Pasteurella*.

RECOMENDACIONES

Continuar la identificación de nuevas bacterias a partir de relaves mineros. Una opción tentativa sería aislar únicamente bacterias de los sedimentos de relaves para encontrar bacterias capaces de oxidar el arsenito.

Realizar el aislamiento de bacterias que resistan a varios de los metales pesados encontrados en los relaves mineros, para conocer su comportamiento frente a varios compuestos tóxicos.

Con el método aplicado en esta investigación, se recomienda continuar la investigación para evaluar la acción de las bacterias con el arsénico de desechos industriales, agrícolas, etc.

Las bacterias evaluadas resisten concentraciones de arsénico superiores a las encontradas en los relaves mineros de la compañía, por lo tanto es posible usarlas en tratamientos biotecnológicos, para lo cual es necesario realizar un estudio más específico.

BIBLIOGRAFÍA

AHUMADA, G. Arsénico en el agua potable: una preocupación a nivel global. Santiago – Chile. 2014. pp. 34-38.

<http://www.aidis.cl/files/revista-mayo/GAhumada-Arsenico2014.pdf>.

2015-10-10

ALBORES, A. QUINTANILLA, B. DEL RAZO, M. CEBRIÁN, M. Arsénico. México D.F. – México. pp. 248-250.

<http://www.bvsde.ops-oms.org/bvstox/fulltext/toxico/toxico-03a15.pdf>

2015-10-14

ARA, S. CHOQUE, A. AVENDAÑO, E. Revista Ciencia y Desarrollo. Resistencia y degradación de Arsénico por la comunidad bacteriana de las aguas del río Maure-Tacna. Perú. Lima- Perú. 2007. pp. 189-194.

<http://www.unjbg.edu.pe/coin2/pdf/08-2009.pdf>

2015-10-08

CAMEAN, A. Toxicología Avanzada. Madrid – España. 1995. pp. 75-96.

<https://books.google.com.ec/books?id=opad2FFk9g0C&pg=PA336&dq=arsenito+de+sodio&hl=es&sa=X&ved=0CCEQ6AEwAWoVChMI5NHfkriHyQIVA6oeCh2ffgUr#v=onepage&q&f=false>.

2015-10-11

CAMPOS, V. VALENZUELA, C. ALCORTA, M. ESCALARTE, G. MONDACA, M. Revista Gayana. Aislamiento de bacterias resistentes a Arsénico desde muestras de rocas volcánicas de la quebrada Camarones. Santiago - Chile. 2007. pp.150-155.

http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-65382007000200003.

2015-10-15

CARABANTES, A. FERNICOLA, N. Revista Scielo. Arsénico en el agua de bebida: un problema de salud pública. Brasil. 2003. pp. 365-372.

http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-93322003000400003&script=sci_arttext.

2015-10-13

CASTILLO, F. Biotecnología Ambiental. Madrid - España. 2005. pp. 35-62.

https://books.google.com.ec/books?id=19ffPAm3E3kC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.

2015-10-11

CISNEROS, P. ¿Cómo se construye la sustentabilidad ambiental? Análisis de experiencias conflictivas de la industria Minera en el Ecuador. Tesis Doctoral. Facultad Latinoamericana de Ciencias Sociales Sede Ecuador. Ciencias Sociales. Quito - Ecuador. 2011. pp. 26-30.

2015-10-20

CHILE. EL DIARIO. Arsénico: Silencioso enemigo en la Región de Antofagasta. Santiago – Chile. 2012.

<http://www.diarioantofagasta.cl/regional/14937/arsenico-silencioso-enemigo-en-la-region-de-antofagasta/>.

2015-10-14

CURTIS, H. SUE BARNES, N. Biología. 6ta Ed. Barcelona – España. 2001. pp 82-85.

2015-11-12

DOMÉNECH, X. PÉREZ, J. Química ambiental de sistemas terrestres. Barcelona – España. 2006. pp. 56-62.

<https://books.google.com.ec/books?id=S4bjFOEXRzMC&printsec=frontcover&dq=qu%C3%ADmica+ambiental+de+sistemas+terrestres&hl=es&sa=X&ved=0CB0Q6AEwAGoVChMik7r28NjmyAIVBqweCh16TA3F#v=onepage&q=qu%C3%ADmica%20ambiental%20de%20sistemas%20terrestres&f=false>.

2015-10-21

DURÁN, J. Diagnóstico de la contaminación por mercurio en aguas y sedimentos de ríos que reciben efluentes de la minería de oro en los sectores de Nambija, Ponce Enríquez y Portovelo Tesis. ESPE. Ciencias. Ciencias de la Tierra y la Construcción. Quito - Ecuador. 2008. pp. 1-4.

<http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/785/1/T-ESPE-018375.pdf>.

2015-10-23

ECUADOR. ASAMBLEA NACIONAL. Acuerdo ministerial no. 028. Libro VI del Texto Unificado de Legislación Secundaria. Quito – Ecuador. 2015. pp. 98-100.

<http://ecuadorforestal.org/wp-content/uploads/2010/05/Libro-VI-Calidad-Ambiental.pdf>.

2015-10-14

ECUADOR. ASAMBLEA NACIONAL. Ley de Minería. Quito – Ecuador. 2009. pp. 32-45.

<http://www.hidrocarburos.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2015/02/Ley-de-Mineria.pdf>.

2015-10-18

ECUADOR. CÁMARA DE MINERÍA. Crónica minera. Quito - Ecuador. 2013.

<http://www.cme.org.ec/>.

2015-10-12

ECUADOR. FUNDACIÓN ECOLÓGICA ARCOIRIS. Impactos Socioambientales de la Minería a los Recursos Naturales y a la Salud Humana. Loja - Ecuador. 2006. pp. 13-30.

2015-10-05

ECUADOR. INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA Y CENSOS. Población y Demografía. Quito – Ecuador. 2010.

<http://www.ecuadorencifras.gob.ec/>.

2015-10-06

ECUADOR. NTE INEN 1108: 2014. Agua potable. Requisitos. Quito – Ecuador. 2014. pp. 1-2.

2015-10-21

ECUADOR. SECRETARIA NACIONAL DE PLANIFICACIÓN Y DESARROLLO. Plan Buen Vivir 2013-2017. Quito – Ecuador. 2013.

<http://www.planificacion.gob.ec/>.

2015-10-26

ESPAÑA. FICHAS INTERNACIONALES DE SEGURIDAD QUÍMICA. Arseniato de sodio. Madrid - España. 1994.

<http://www.insumoslabcentral.unlu.edu.ar/sites/www.insumoslabcentral.unlu.edu.ar/files/site/Sodio%20Arseniato%207%20H2O.pdf>.

2015-10-22

ESPAÑA. FICHAS INTERNACIONALES DE SEGURIDAD QUÍMICA. Arsenito de sodio. Madrid - España. 2006.

<http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/FISQ/Ficheros/1582a1603/1603.pdf>

2015-10-20

ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA. AGENCIA PARA SUSTANCIAS TÓXICAS Y EL REGISTRO DE ENFERMEDADES. Arsénico. Atlanta – Estados Unidos. 2014.

http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts2.html#bookmark1.

2015-10-07

ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA. AGENCIA PARA SUSTANCIAS TÓXICAS Y EL REGISTRO DE ENFERMEDADES. Cianuro. Atlanta – Estados Unidos. 2014.

http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs8.html.

2015-10-07

ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA. AGENCIA PARA SUSTANCIAS TÓXICAS Y EL REGISTRO DE ENFERMEDADES. Cobre. Atlanta – Estados Unidos. 2014.

http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts132.html.

2015-10-08

ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA. AGENCIA PARA SUSTANCIAS TÓXICAS Y EL REGISTRO DE ENFERMEDADES. Consulta de salud. Atlanta – Estados Unidos. 2006.

<http://www.atsdr.cdc.gov/HAC/pha/IslandeViequesBombingRange/ViequesLandCrabHealthConsultationUpdate-s.pdf>.

2015-10-08

ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA. AGENCIA PARA SUSTANCIAS TÓXICAS Y EL REGISTRO DE ENFERMEDADES. Níquel. Atlanta – Estados Unidos. 2014.

http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts15.html.

2015-10-09

ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA. AGENCIA PARA SUSTANCIAS TÓXICAS Y EL REGISTRO DE ENFERMEDADES. Nitrato y nitrito. Atlanta – Estados Unidos. 2015.

http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs204.pdf.

2015-10-09

ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA. DEPARTAMENTO DE SALUD Y SERVICIOS PARA PERSONAS MAYORES DE NEW JERSEY. Arsenito de sodio. New jersey – Estados Unidos. 2002.

<http://nj.gov/health/eoh/rtkweb/documents/fs/1683sp.pdf>.

2015-10-15

ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA. EL MUNDO. Denuncian nuevas localizaciones de agua contaminada con arsénico en EEUU. Washington – Estados Unidos. 2011.

http://www.elmundo.es/america/2011/12/14/estados_unidos/1323824087.html.

2015-10-18

FARAH, R. IRAM, A. REHMAN, A. SHAKOORI, R. Revista Pakistan journal of zoology. Isolation and Characterization of Arsenic Reducing Bacteria from Industrial Effluents and their Potential Use in Bioremediation of Wastewater. Islamabad - Pakistán. 2010. pp. 331-338.

https://www.researchgate.net/publication/258022850_Isolation_and_Characterization_of_Arsenic_Reducing_Bacteria_from_Industrial_Effluents_and_their_Potential_Use_in_Bioremediation_of_Wastewater.

2015-10-23

HERNÁNDEZ, A. Microbiología Industrial. San José - Costa Rica. 2003. pp. 64-68.

https://books.google.com.ec/books?id=KFq4oEQQjdEC&pg=PR6&lpg=PR6&dq=microbiolog%C3%ADa+industrial+hernandez&source=bl&ots=N_rPQKd37u&sig=n_UjjARFUKTrEHQQ6h67Fk52cew&hl=es&sa=X&ved=0CB4Q6AEwAGoVChMIRPNzuPmyAIVidYeCh1uVwAt#v=onepage&q=microbiolog%C3%ADa%20industrial%20hernandez&f=false.

2015-10-15

INFANTE, P. Revistas Científicas de America Latina. Estudio de la contaminación por metales pesados en sedimentos y ostiones de la Bahía de Manzanillo, Cuba . La Habana – Cuba. 2002. pp. 357-361.

<http://www.redalyc.org/pdf/475/47546411.pdf>.

2015-10-22

JIMÉNEZ, B. La contaminación ambiental en México. México D.F. - México. 2001. pp. 87-91.

https://books.google.com.ec/books?id=8MVxlyJGokIC&pg=PA54&dq=ars%C3%A9nico+en+agua&hl=es&sa=X&ved=0CCAQ6AEwAWoVChMIrYOwr8_yAIVS5oeCh3cRwUg#v=onepage&q=ars%C3%A9nico%20en%20agua&f=false.

2015-10-21

MANAHAN, STANLEY E. Introducción a la química ambiental. D.F. - México. 2007. pp. 152-155.

2015-10-2

MELLADO, C. BADILLA, C. ESCALENTE, G. CAMPOS, V. MONDACA, M. Revista Afinidad. Transformación de arsénico por bacterias aisladas de sedimentos enriquecidos con el metaloide. Santiago – Chile. 2008. pp. 37-41.

<http://www.raco.cat/index.php/afinidad/article/view/281766>.

2015-11-01

MÉXICO. REACTIVOS QUÍMICA MEYER. Arsenato de sodio. México D.F. - México. 2008.

http://reactivosmeyer.com.mx/pdf/reactivos/hds_2275.pdf.

2015-10-21

MÉXICO. REACTIVOS QUÍMICA MEYER. Arsenito de sodio. México D.F. - México. 2008.

http://reactivosmeyer.com.mx/pdf/reactivos/hds_2280.pdf.

2015-10-21

MINEREICIS S.A. Manual de trabajo. Machala - Ecuador. 2010. pp. 3-13.

2015-10-05

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. El Mercurio y salud. Ginebra – Suiza. 2013.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs361/es/>.
2015-10-12

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Intoxicación por plomo y salud. Ginebra – Suiza. 2015.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs379/es/>.
2015-10-12

PACHECO, G. MONDRAGÓN, V. VELÁZQUEZ, J. Revista Bio Ciencias. Oxidación del arsénico regulada por un sistema bacteriano de dos componentes. México D.F. – México. 2013. pp. 92-97.
<http://biociencias.uan.edu.mx/publicaciones/04-03/biociencias4-3-1.pdf>.
2015-10-17

SIMEONOVA, D. Arsenic oxidation of *Cenibacterium arsenoxidans*: Potential application in bioremediation of arsenic contaminated water Tesis Doctoral. Universidad Louis Pasteur. Ciencias de la vida. Strasbourg - Francia. 2004. pp. 10-32.
<http://scd-theses.u-strasbg.fr/859/01/Simeonova2004.pdf>.
2015-11-01

SIMEONOVA, D. LIÈVREMONT, D. LAGARDE, F. MULLER, D. GROUDEVA, V. LETT, M. Revista Micorbiology letters. Microplate screening assay for the detection of arsenite-oxidizing and arsenate-reducing bacteria. París – Francia. 2004. pp. 249–253.
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09703.x/abstract>
2015-10-21

TORTORA, G. FUNKE, B. Introducción a la microbiología. Zaragoza - España. 1993. pp. 3-5.
2015-10-24

ANEXOS

Anexo 1: Caracterización de los relaves mineros





Acreditación N° OAE LE 20 05-209
LABORATORIO DE ENSAYOS

REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: COMPAÑIA MINERA MINEREICIS SA
Av. 25 de Junio s/n y Vía Pasaje Km 1 1/2
Telf: 072-982-434

Atn: Ing. Johana Dávila Loayza

Proyecto: Análisis de Agua

Muestra Recibida: 01-oct-15

Tipo de Muestra: 1 Muestra de Agua

Análisis Completado: 15-oct-15

Número reporte Gruntec: 1510014-AG001

Rotulación Muestra:	M1,M2,M3,M4	Limite Máximo Permisible Tabla 10 TULSMA d)	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	30-sep-15		
No. Reporte Gruntec:	1510014-AG001		
Físico Químico:			
pH ^{(1),(2)}	7.9	6 - 9	SM 4500 H / MM-AG/S-01
Conductividad μ S/cm ^{(1),(2)}	829	N/A	EPA 9050 A / MM-AG/S-02
Aniones y No Metales:			
Cianuro Total mg/L ^{(1),(2)}	0.0038	0.1	SM 4500 CN / MM-AG-28
Parámetros Microbiológicos:			
Coliformes Fecales NMP/100 mL ^{(1),(2)}	<30	10000	SM 9223 A,B / MM-AG/S-20
Coliformes Totales NMP/100 mL ^{(1),(2)}	1500	N/A	SM 9223 A,B / MM-AG/S-20
Metales totales:			
Arsénico mg/L ^{(1),(2)}	232 ^{(3),(4)}	0.1	EPA 8020 A / MM-AG/S-39
Bario mg/L ^{(1),(2)}	1.6 ^{(3),(4)}	2.0	EPA 8020 A / MM-AG/S-39
Boro mg/L ^{(1),(2)}	0.27 ^{(3),(4)}	2.0	EPA 8020 A / MM-AG/S-39
Cadmio mg/L ^{(1),(2)}	0.54 ^{(3),(4)}	0.02	EPA 8020 A / MM-AG/S-39
Cobalto mg/L ^{(1),(2)}	2.4 ^{(3),(4)}	0.5	EPA 8020 A / MM-AG/S-39
Cobre mg/L ^{(1),(2)}	12 ^{(3),(4)}	1.0	EPA 8020 A / MM-AG/S-39
Fósforo mg/L ^{(1),(2)}	41 ^{(3),(4)}	10.0	EPA 8020 A / MM-AG/S-39
Hierro mg/L ^{(1),(2)}	6996 ^{(3),(4)}	10.0	EPA 8020 A / MM-AG/S-39
Manganeso mg/L ^{(1),(2)}	195 ^{(3),(4)}	2.0	EPA 8020 A / MM-AG/S-39
Mercurio mg/L ^{(1),(2)}	0.025 ^{(3),(4)}	0.005	EPA 8020 A / MM-AG/S-39
Niquel mg/L ^{(1),(2)}	3.1 ^{(3),(4)}	2.0	EPA 8020 A / MM-AG/S-39



REPORTE DE ANÁLISIS

Cliente: COMPAÑIA MINERA MINEREICIS SA

Av. 25 de Junio s/n y Vía Pasaje Km 1 1/2

Tel: 072-982-434

Atn: Ing. Johana Dávila Loayza

Proyecto: Análisis de Agua

Muestra Recibida: 01-oct-15

Tipo de Muestra: 1 Muestra de Agua

Análisis Completado: 15-oct-15

Número reporte Gruentec: 1510014-AG001

Rotulación Muestra:	M1,M2,M3,M4	Límite Máximo Permisible Tabla 10 TULSMA d)	Método Adaptado de Referencia / Método Interno
Fecha de Muestreo:	30-sep-15		
No. Reporte Grúntec:	1510014-AG001		
Metales totales:			
Plata mg/L ^{(1),(2)}	0.16 ^{(3),(4)}	0.1	EPA 8020 A / MM-AG/S-39
Plomo mg/L ^{(1),(2)}	22 ^{(3),(4)}	0.2	EPA 8020 A / MM-AG/S-39
Selenio mg/L ^{(1),(2)}	0.026 ^{(3),(4)}	0.1	EPA 8020 A / MM-AG/S-39
Sodio mg/L ^{(1),(2)}	88 ^{(3),(4)}	N/A	EPA 8020 A / MM-AG/S-39
Zinc mg/L ^{(1),(2)}	44 ^{(3),(4)}	5.0	EPA 8020-A / MM-AG/S-39

Registros y Acreditaciones:

⁽¹⁾ Acreditación No. OAE LE 2C 05-008

⁽²⁾ Registro SA / MDMQ No. LEA-R-005

⁽³⁾ Acreditación CALA No. A3154

Los ensayos marcados con (*) no están dentro del alcance de acreditación del SAE

N/A - No Aplica

a) Debido a la naturaleza de la muestra se realizó una dilución 4X.

b) Método de Digestión EPA 3005A

c) Límites de descarga a un cuerpo de agua dulce. Anexo I, A.M. 051, Anexos A, M. 028.

INCERTIDUMBRE (U) para pH = 0.2 unidades

INCERTIDUMBRE (U):

Metales en Agua = 0.30; Conductividad en agua = 0.11; Cianuro Total = 0.22

Cálculo: C +/- UxC en donde: C=valor medido; U= incertidumbre.

X Juan Isabel Estrella
Ing. Isabel Estrella

Gerente de Operaciones

Nota 1: Estos análisis, opiniones y/o interpretaciones están basados en el material e información provistos por el cliente para quien se ha realizado este reporte en forma exclusiva y confidencial.

Nota 2: La toma de muestras fue realizada directamente por el cliente.

Nota 3: El cliente puede solicitar la fecha de análisis de los parámetros en caso de requerirlo.

Página 2 de 2.

Anexo 2: Absorbancia de las cepas aisladas.

Absorbancia de las cepas aisladas.

PRUEBAS DE OXIDACIÓN/REDUCCIÓN		
Cepas aisladas a temperatura ambiente		
Origen	N°	Absorbancia (540nm)
M1-2	1	0,491
M1-R	2	0,292
M2-L	5	0,216
M3-2	10	0,397
M3-2	11	0,161
M3-L	15	0,483
M3-L	16	0,216
M3-L	18	0,248
M3-R	19	0,474
Cepas aisladas a 30°C		
Origen	N°	Absorbancia (540nm)
M1-2	2	0,312
M1-R	5	0,346
M1-L	9	0,444
M2-R	15	0,093
M3-2	16	0,306
M3-2	21	0,395
M3-L	22	0,41
M3-R	25	0,365
M3-R	26	0,153

Realizado por: (Anabell Duque, 2015).

Anexo 3: Pruebas bioquímicas



Realizado por: (Anabell Duque, 2015)

Anexo 4: Temperaturas de la ciudad de Riobamba.

Temperaturas de la ciudad de Riobamba

Año	Mes	Temperatura mínima (°C)	Temperatura máxima (°C)	Temperatura media (°C)
2015	Octubre (media)	9,7	22,0	14,0
	Noviembre (media)	9,8	21,5	14,0
	Diciembre (media)	9,2	21,9	14,0
	Octubre (máxima 24h)	15,2	25,4	11,2
	Noviembre (máxima 24h)	12,0	25,0	15,7
	Diciembre (máxima 24h)	11,8	24,6	15,8
	Octubre (mínima 24h)	3,4	18,4	12,2
	Noviembre (mínima 24h)	4,8	14,6	11,5
	Diciembre (mínima 24h)	2,6	18,3	12,2

Fuente: Estación agrometeorológica. Facultad de Recursos Naturales. ESPOCH.

Realizado por: (Anabell Duque, 2015)