



# UNIVERSIDAD DE CUENCA

Facultad de Ciencias Químicas  
Carrera de Ingeniería Ambiental

Resistencia y capacidad para remover mercurio, de bacterias  
aisladas desde los suelos de las zonas mineras de Portovelo en  
Ecuador

Trabajo de titulación previo a  
la obtención del título de  
Ingeniero Ambiental

Autor:  
Juan Diego Pacheco Fajardo  
C.I.: 0105874648  
juandipacheco@gmail.com

Tutor:  
Biol. Pablo Patricio Jara Torres, Ph. D  
C.I.: 0102608700

Cotutor:  
Bq. Wilson Geovanny Larriva Larriva, Ph. D  
C.I.: 0102194248

**Cuenca, Ecuador**  
16 de Julio de 2021



## RESUMEN

En este estudio se aislaron dos cepas de bacterias Gram negativas de los suelos de tres zonas mineras del cantón Portovelo con el objetivo de determinar su resistencia a diferentes concentraciones de mercurio (Hg) y evaluar su capacidad para remover este metal. Tres muestras de suelo fueron recolectadas de forma aleatoria, en lugares donde se detectó la utilización de Hg en la separación de oro. Se evaluó *in vitro* la capacidad de resistencia de las bacterias al Hg, para ello, se extrajeron las bacterias del suelo inoculando 1 g de suelo en medios de cultivo sólidos; las bacterias que crecieron y se desarrollaron en estos medios fueron sembradas en medios que contenían concentraciones de 0; 50; y 100 ppm de cloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>). Dos cepas de bacterias denominadas como BA y BN, presentaron resistencia a las distintas concentraciones de HgCl<sub>2</sub>, estas dos cepas fueron identificadas como un bacilo Gram Negativo y un coco Gram Negativo respectivamente. Para evaluar la capacidad de remover Hg, las dos cepas bacterianas fueron inoculadas por 5 días en medio líquido con concentraciones de 50 y 100 ppm de HgCl<sub>2</sub>, luego de haber transcurrido el tiempo de inoculación, la concentración de Hg en los medios fue menor a 3 ppm, lo que supone porcentajes de remoción mayores al 96% por parte de las dos cepas. Con el fin de verificar que esa reducción de concentración de Hg fue dada por acción de las bacterias, también, se midió la concentración inicial y final de Hg en medios que no contenían bacterias, luego de haber transcurrido 5 días, la concentración en esos medios no varió significativamente, lo que sugiere que la remoción de Hg fue dada por acción microbiana en los medios que si contenían bacterias. Los resultados de esta investigación contribuyen de manera directa al diseño de estrategias de biorremediación para los suelos contaminados por actividades mineras de las zonas de Portovelo.

**Palabras Clave:** Bacterias. Suelo. Mercurio. Resistencia. Remoción.



## ABSTRACT

In this study, two strains of Gram negative bacteria were isolated from the soils of three mining areas of the Portovelo canton with the objective of determining their resistance to different concentrations of mercury (Hg) and evaluating their ability to remove this metal. Three soil samples were collected at random, in places where the use of Hg was detected in the separation of gold. The resistance capacity of the bacteria to Hg was evaluated in vitro, for this, the bacteria were extracted from the soil by inoculating 1 g of soil in solid culture media; the bacteria that grew and developed in these media were reseeded in media containing concentrations of 0; fifty; and 100 ppm of mercury chloride (HgCl<sub>2</sub>). Two strains of bacteria named BA and BN, showed resistance to different concentrations of HgCl<sub>2</sub>, these two strains were identified as a Gram Negative bacillus and a Great Negative coco, respectively. To evaluate the ability to remove Hg, the two bacterial strains were inoculated for 5 days in liquid medium with concentrations of 50 and 100 ppm of HgCl<sub>2</sub>, after the inoculation time had elapsed, the concentration of Hg in the media was less than 3 ppm, which means removal percentages greater than 96% by the two strains. In order to verify that this reduction in Hg concentration was given by the action of bacteria, the initial and final concentration of Hg in media that did not contain bacteria was also measured, after 5 days, the concentration in those media it did not change significantly, which suggests that the removal of Hg was caused by microbial action in the media that did contain bacteria. The results of this research contribute directly to the design of bioremediation strategies for soils contaminated by mining activities in the Portovelo areas.

**Keywords:** Bacteria. Soil. Mercury. Resistance. Removal.



## Índice de Contenidos

RESUMEN .....	2
ABSTRACTT .....	3
Índice de Contenidos .....	4
Índice de Tablas .....	6
Índice de Figuras.....	7
Índice de Anexos .....	7
AGRADECIMIENTOS .....	9
DEDICATORIA .....	12
1. INTRODUCCIÓN.....	13
2. OBJETIVOS .....	15
2.1 Objetivo General .....	15
2.2 Objetivos específicos .....	15
3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE .....	15
3.1 Suelo.....	15
3.2 Metales Pesados .....	16
3.3 Factores que inciden en la biodisponibilidad de metales pesados en el suelo .	16
3.3.1 Textura.....	16
3.3.2 pH del suelo .....	16
3.3.3 Capacidad de intercambio catiónico .....	17
3.3.4 Materia orgánica del suelo (MOS).....	17
3.3.5 Potencial de óxido-reducción (redox).....	17
3.4 Mercurio.....	17
3.5 Ciclo biogeoquímico del mercurio.....	18
.....	19



3.6	Fuentes de contaminación del mercurio.....	19
3.6.1	Fuentes Naturales.....	19
3.6.2	Fuentes antropogénicas.....	19
3.7	Mercurio en el suelo.....	20
3.8	Toxicidad del mercurio en la salud humana .....	21
3.9	Biorremediación.....	22
3.9.1	Biorremediación de Metales Pesados .....	22
3.9.2	Biorremediación de Hg.....	23
3.10	Bacterias.....	25
3.11	Crecimiento microbiano.....	25
3.12	Identificación bacteriana .....	26
3.12.1	Características microscópicas.....	26
3.12.2	Características macroscópicas .....	26
3.12.3	Tinción de Gram .....	26
3.12.4	Prueba de la oxidasa .....	27
3.12.5	Prueba de la catalasa .....	27
3.12.6	Agar MacConkey.....	27
3.12.7	Agar King A y King B.....	28
3.13	ESTADO DEL ARTE.....	28
4.	METODOLOGÍA.....	33
4.1	Área de estudio.....	33
4.2	Toma de muestras .....	34
4.3	Determinación de la concentración mercurio en las muestras de suelo.....	36
4.4	Cultivo, selección y aislamiento de las bacterias resistentes a mercurio .....	37
4.4.1	Cinética de crecimiento Bacteriano .....	38
4.4.2	Identificación Bacteriana .....	39



4.5	Determinación de la capacidad para remover mercurio de las bacterias seleccionadas.....	39
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
5.1	Concentración de mercurio en las tres muestras de suelo de tres sitios de Portovelo.....	40
5.2	Grupos de bacterias de la zona minera de Portovelo resistentes a medios contaminados con Hg.....	42
5.2.1	Aislamiento de microorganismos resistentes a Hg.....	42
6.2.2	Grupos identificados de bacterias resistentes al Hg.....	44
6.3	Cinética de crecimiento Bacteriano.....	49
6.4	Remoción de Hg por parte de las bacterias aisladas.....	54
6.	CONCLUSIONES.....	58
8.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
9.	ANEXOS.....	78

### Índice de Tablas

Tabla 1.	Factores del ecosistema afectados por la minería en diferentes investigaciones.....	28
Tabla 2.	Diferentes microorganismos (bacterias, hongos y algas) implicados en la remoción de Hg y compuestos derivados.....	31
Tabla 3.	Coordenadas de los puntos de muestreo en el sistema UTM.....	34
Tabla 4.	Establecimiento de microorganismos en medios de cultivo con diferentes concentraciones de HgCl <sub>2</sub> .....	43
Tabla 5.	Resultados de las pruebas bioquímicas aplicadas para identificar los grupos de bacterias.....	45
Tabla 6.	UFC de las cepas de bacilos y cocos desarrolladas en 0; 50; y 100 ppm de HgCl <sub>2</sub> .....	51
Tabla 7.	Porcentaje de remoción de Hg en medio líquido.....	56

## Índice de Figuras

Figura 1. Ciclo Biogeoquímico del Hg. ....	19
Figura 2. Mapa del Cantón Portovelo. ....	33
Figura 3. Puntos de muestreo. ....	35
Figura 4. Concentración de Hg en el suelo de los sitios examinados de la zona minera de Portovelo. ....	42
Figura 5. Cultivo de la cepa denominada “BA”, un bacilo Gram Negativo. ....	46
Figura 6. Cultivo de la cepa denominada “BN”, un Coco Gram Negativo. ....	46
Figura 7. Cepa BA vista en el microscopio. ....	47
Figura 8. Cepa BN vista en el microscopio. ....	47
Figura 9. Tinción Gram de la cepa BN. ....	48
Figura 10. Tinción Gram de la cepa BA. ....	48
Figura 11. Cinética de crecimiento bacteriano de las dos cepas de bacterias en diferentes concentraciones de HgCl <sub>2</sub> , de la réplica 1. ....	52
Figura 12. Cinética de crecimiento bacteriano de las dos cepas de bacterias en diferentes concentraciones de HgCl <sub>2</sub> , de la réplica 2. ....	53
Figura 13. Concentración de Hg en los medios líquidos luego de 5 días de inoculación. ....	57
Figura 14. Biopelículas bacterianas en los Erlenmeyers luego de 5 días de incubación. ....	57

## Índice de Anexos

Anexo 1. Concentración de Hg en muestras cercanas a zonas mineras ....	78
Anexo 2. Composición e indicaciones generales del Agar MacConkey. ....	79
Anexo 3. Composición e indicaciones generales del Agar Sabourad Dextrose. ....	80
Anexo 4. Concentración de la muestra de suelo M1. ....	81
Anexo 5. Concentración de la muestra de suelo M2. ....	82
Anexo 6. Concentración de Hg del medio líquido en donde se sembró la cepa BN con 100 ppm de HgCl <sub>2</sub> . (R1).....	83
Anexo 7. Concentración de Hg del medio líquido en donde se sembró la cepa BN con 50 ppm de HgCl <sub>2</sub> (R1).....	84
Anexo 8. Concentración de Hg del medio líquido en donde se sembró la cepa BA con 50 ppm de HgCl <sub>2</sub> (R1). ....	85



Anexo 9. Concentración de Hg del medio líquido en donde se sembró la cepa BA con 50 ppm de HgCl<sub>2</sub> (R1)..... 86

Anexo 10. Concentración de Hg del medio líquido en donde se sembró la cepa BA con 50 ppm de HgCl<sub>2</sub> (R2)..... 87

Anexo 11. Concentración de Hg del medio líquido en donde se sembró la cepa BA con 100 ppm de HgCl<sub>2</sub> (R2)..... 88

Anexo 12. Concentración de Hg del medio líquido en donde se sembró la cepa BN con 100 ppm de HgCl<sub>2</sub> (R2)..... 89

Anexo 13. Concentración de Hg del medio líquido en donde se sembró la cepa BB con 50 ppm de HgCl<sub>2</sub> (R2)..... 90





### Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Juan Diego Pacheco Fajardo autor del trabajo de titulación "Resistencia y capacidad para remover mercurio, de bacterias aisladas desde los suelos de las zonas mineras de Portovelo en Ecuador", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 16 de julio del 2021

---

Juan Diego Pacheco Fajardo

C.I.: 0105874648



### Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

---

Juan Diego Pacheco Fajardo autor del trabajo de titulación “Resistencia y capacidad para remover mercurio, de bacterias aisladas desde los suelos de las zonas mineras de Portovelo en Ecuador”, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 16 de julio del 2021.

Juan Diego Pacheco Fajardo

C.I.: 0105874648



## AGRADECIMIENTOS

Agradezco primero a Dios por todas las bendiciones derramadas durante todo este tiempo de carrera universitaria, él siempre ha sido el pilar fundamental para levantarme ante cada adversidad y gracias a él hoy puedo dar un paso muy importante en mi vida.

Al biólogo Pablo Jara, mi tutor, por su paciencia y por toda la dedicación que ha sabido poner a lo largo de este trabajo. Gracias por todos sus consejos y por su guía, estoy seguro que me servirán para toda la vida.

Al doctor Geovanni Larriva, mi cotutor y amigo, por toda su atención, tiempo, y generosidad. Gracias por ayudarme a sacar adelante un trabajo de titulación que lo planteamos juntos.

A la ingeniera Katherine Pesántez, mi compañera de aula y amiga por darme soporte en cada procedimiento realizado durante este trabajo. Además, estoy enormemente agradecido por su amistad incondicional.

A mis padres por toda su paciencia y amor. Gracias por enseñarme que con esfuerzo y humildad se puede conseguir cualquier meta.

Por último, a la Universidad de Cuenca, a la facultad de Ciencias Químicas, especialmente a la carrera de Ingeniería Ambiental, gracias por ser ejemplo de desarrollo, conocimientos e investigación. De igual forma, a todos los docentes y compañeros que me acompañaron en este camino, cada uno fue muy importante para lograrlo.



## DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico primeramente a Dios, con él todo es posible; y luego a mis padres por todo el amor que me brindan a diario, y por su invaluable lucha por forjar en mí un ser humado de bien, útil para la sociedad. También se lo dedico a mi familia y amigos ya que ellos hacen que Jota Di día a día se esfuerce por ser una persona digna de admirar.



## 1. INTRODUCCIÓN

En los suelos del cantón Portovelo existen elevadas concentraciones de metales pesados producidas por la actividad minera (Betancourt et al., 2005; Guerra & Zaldumbide, 2010; López et al., 2016). Principalmente se encuentran altas concentraciones de mercurio (Hg), el cual proviene de mineras artesanales e ilegales que utilizan este metal para separar el oro de otros elementos (Marín et al., 2016); en estas zonas se han evidenciado concentraciones de Hg de hasta 35,90 mg/kg en relaves mineros, lo cual supera los valores permitidos por la Norma de “*Calidad Ambiental del Recurso Suelo y Criterios de Remediación para Suelos Contaminados*” (NCAS) que rige en el Ecuador (<10 mg/kg) (Oviedo et al., 2017). Esto representa un grave problema para los ecosistemas y la salud de las personas que viven en el cantón Portovelo, por ello, es indispensable desarrollar tecnologías locales amigables con la naturaleza que contribuyan a la remediación de estos suelos (Betancourt et al., 2005).

En las mineras artesanales y a pequeña escala el proceso más utilizado para recuperar el oro es el proceso de amalgamación, que consiste en agregar Hg al material rocoso que contiene oro, con el propósito de formar una amalgama que facilite la separación del oro con el material rocoso. La amalgama formada entre el Hg y el oro normalmente es separada mediante la vaporización de Hg, al someterla a altas temperaturas. La amalgamación es un proceso simple y solo requiere una pequeña inversión, sin embargo, es una gran fuente de contaminación por Hg (Chasanah et al., 2018). Los relaves de los procesos de amalgamación en forma de lodos que todavía contienen Hg, Au y otros metales pesados, normalmente no tienen un correcto tratamiento y se descargan en tierras agrícolas y cuerpos de agua cercanos. Además, durante la vaporización de Hg se ha reportado que por cada gramo de oro producido, se liberan al aire entre 1 y 3 g de Hg, que posteriormente pueden depositarse en el suelo o en fuentes de agua cercanas (Telmer, 2007).

Las altas concentraciones de Hg en el medio terrestre son una gran amenaza para todo el ecosistema (Marín et al., 2016). En primer lugar, pueden ser letales para varias especies de organismos que viven en ese medio (Millán et al., 2017; Arroyave et al., 2019) y además, pueden bioacumularse en las especies vegetales (principalmente) y de esta manera ingresar en la cadena trófica (Durango et al., 2010; Beltrán & Gómez, 2016). En segundo lugar, el Hg puede ser arrastrado hacia las fuentes de agua y bioacumularse en



la flora y fauna fluvial, ingresando también de esta manera en la cadena alimenticia (Lominchar et al., 2014). En muchos estudios se ha evidenciado como el Hg puede llegar a bioacumularse en el organismo de los peces llegando a niveles que constituyen una amenaza, tanto para el ser humano como para otras especies que se alimentan de los peces (Betancourt et al., 2005; Diaz, 2015). Las especies de organismos vivos que conforman los eslabones tróficos superiores en los ecosistemas, también son muy sensibles a la contaminación por Hg; por ejemplo, se ha documentado como un grupo de aves que se alimenta de peces, puede llegar a acumular concentraciones superiores a 20 mg/kg en el hígado y a 5 mg/kg en las plumas, lo que ocasiona efectos negativos en su crecimiento y reproducción (Albuja et al., 2012).

El Hg ha sido reconocido como el metal pesado más tóxico en el medio ambiente, es por ello, que ecosistemas contaminados con este metal constituyen una de las afecciones más peligrosas para la salud humana y el medio ambiente (Doadrio, 2004; Yarto et al., 2014; S. Covarrubias et al., 2015); debido a su toxicidad, movilidad, capacidad de bioacumulación y tiempo de residencia en la atmósfera (Gracia et al., 2010; Weinberg, 2010). En la actualidad a nivel mundial se trabaja en el desarrollo de tecnologías y estrategias que permitan detoxificar del medio ambiente compuestos tóxicos de Hg (Le & Terry, 2005; Garzón & Rodríguez, 2015).

La mayoría de microorganismos mueren o disminuyen su capacidad de crecimiento cuando se contamina un suelo con Hg, puesto que se alteran las características y propiedades naturales de su medio de crecimiento (Barkay & Wagner, 2005; Rocha et al., 2018), sin embargo, existen microorganismos como por ejemplo, algunos grupos de bacterias, que son capaces de resistir concentraciones altas de Hg y pueden bioacumular este elemento (González, 2005; Durán & Hernández, 2017).

En las zonas mineras de Ecuador, es indispensable desarrollar y aplicar tecnologías y estrategias que permitan remediar los suelos contaminados con Hg. Por esta razón, en este trabajo de titulación se investigó sobre el potencial que tienen las bacterias nativas de los suelos mineros de Portovelo para resistir y remover este elemento de un medio en particular.

Si identificamos y caracterizamos los microorganismos nativos del suelo de Portovelo que son capaces de desarrollarse en medios con altas concentraciones de Hg y que son



capaces de remover este metal en condiciones controladas de laboratorio, se puede plantear tecnologías de biorremediación de suelos y efluentes contaminados con Hg, por ejemplo, en suelos se pueden desarrollar sistemas de biosorción que utilicen las bacterias como biosorbentes; mientras que en flujos de agua contaminados se puede implementar un bioreactor capaz de utilizar las bacterias aisladas en laboratorio como una biopelícula capaz de adsorber el Hg del flujo contaminante que pasa a través del bioreactor.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo General**

- Evaluar la resistencia a la contaminación por mercurio y la capacidad de remover este contaminante, de bacterias aisladas desde los suelos de zonas mineras del cantón Portovelo.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Determinar la concentración de mercurio en muestras de suelo de las zonas mineras del cantón Portovelo.
- Seleccionar grupos de bacterias que sean resistentes a concentraciones de mercurio consideradas contaminantes para el suelo.
- Determinar el porcentaje de remoción de mercurio en medio líquido por parte de las bacterias resistentes aisladas.

## **3. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE**

### **3.1 Suelo**

El suelo constituye la capa superficial del manto terrestre y su profundidad es variable. Está formado por partículas minerales, organismos vivos, materia orgánica, agua y sales (Anriquez et al., 2005). La mayoría de los componentes provienen de la meteorización de rocas, descomposición de restos vegetales y acción de microorganismos, formando uno de los recursos naturales más importantes del planeta (Volke et al., 2005; Ibáñez, 2011).

La materia orgánica y los compuestos minerales presentes en el suelo se organizan en el espacio generando una estructura porosa, donde puede haber agua o aire. En el agua contenida en estos poros hay sales minerales y nutrientes, lo que permite desarrollar la actividad metabólica de los microorganismos que habitan el suelo (Chesworth, 2008).



### **3.2 Metales Pesados**

Un metal pesado es aquel elemento que presenta un número atómico mayor a 20 y presentan una densidad de al menos  $5 \text{ g/cm}^3$ , bajo este concepto podemos encontrar a 65 elementos de la tabla periódica. Estos elementos suelen presentar propiedades metálicas como conductividad, densidad relativa alta y estabilidad como catión (Morais et al., 2012). Algunos metales pesados como el cobre, el selenio o el zinc son oligoelementos esenciales, con funciones imprescindibles para el desarrollo de distintos microorganismos, plantas y animales pues ejercen roles importantes en algunas reacciones bioquímicas. Sin embargo, existen otros elementos como el mercurio, cadmio, arsénico, cromo, o plomo, que si bien no son una amenaza en concentraciones bajas, representan un verdadero problema en concentraciones elevadas debido a su toxicidad (Koller & Saleh, 2018).

### **3.3 Factores que inciden en la biodisponibilidad de metales pesados en el suelo**

Los factores que influyen en la biodisponibilidad de los metales pesados en un suelo son: textura, pH, capacidad de intercambio catiónico, materia orgánica y potencial de óxido reducción (Covarrubias et al., 2015; Martínez & Uribe, 2015).

#### **3.3.1 Textura**

La textura está determinada por la cantidad de partículas minerales inorgánicas (medidas como porcentajes en peso) de diferentes tamaños (arena, limo y arcillas) que contiene un suelo. La textura de los suelos favorece la infiltración de los metales pesados (Bourg, 1995; Matus & Maire, 2000; Martí et al., 2011). Los suelos ricos en arcillas tienen mayor capacidad para acumular metales debido a su capacidad de fijación. Los suelos arenosos carecen de esta capacidad de fijación, por lo que los metales lixivian rápidamente al subsuelo, llegando a contaminar aguas subterráneas (Galantini & Suñer, 2008; Ibáñez, 2011).

#### **3.3.2 pH del suelo**

El pH del suelo es el principal factor que afecta la biodisponibilidad de gran parte de los metales pesados, pues modifica el equilibrio entre la especiación metálica, solubilidad, adsorción e intercambio de iones en el suelo (Covarrubias et al., 2015; Martínez & Uribe, 2015). Un pH bajo produce la desorción de los metales pesados, aumentando su concentración y biodisponibilidad en los suelos. Por otra parte, pH alto provoca que estos





iones sean eliminados de la solución del suelo y queden adsorbidos en las partículas del suelo, disminuyendo así su biodisponibilidad (Abdu et al., 2017; Covarrubias & Peña, 2017).

### **3.3.3 Capacidad de intercambio catiónico**

La capacidad de intercambio catiónico del suelo expresa el número de moles de iones de carga positivos adsorbidos que pueden ser intercambiados por unidad de masa seca, bajo unas condiciones dadas de temperatura, presión, composición de la fase líquida y una relación de masa-solución dada (Martínez et al., 2008).

### **3.3.4 Materia orgánica del suelo (MOS)**

La MOS presente en el suelo es uno de los principales factores que determinan la biodisponibilidad de los metales pesados, enmiendas con alto contenido de MOS disminuyen la disponibilidad de metales pesados, ya que estos forman enlaces con las sustancias húmicas presentes en el suelo (Wei & Zhou, 2008). Lo anterior puede ocasionar que los metales pesados cambien de una forma soluble e intercambiable a una forma insoluble asociada con MOS o con los carbonatos presentes en la fracción residual del suelo. Los suelos con elevados contenidos en materia orgánica o arcillas generalmente poseen mayores cantidades de mercurio (Matus & Maire, 2000; Johs et al., 2019).

### **3.3.5 Potencial de óxido-reducción (redox)**

La oxidación relativa de los metales en una solución acuosa en ambientes anaerobios reducidos (suelo húmedo) conlleva a la precipitación del metal debido a la presencia de iones ferrosos y carbonatos, mientras que bajo condiciones oxidantes los metales se hacen más solubles (Volke et al., 2005; Alloway, 2013).

## **3.4 Mercurio**

El mercurio (Hg) es un elemento metálico. Considerado como un metal pesado, de color plateado que permanece en estado líquido a temperatura ambiente. Su número atómico es 80, tiene un peso atómico de 200,59 g/mol, su temperatura de fusión es de -38,87 °C, su temperatura de ebullición de 356,58 °C, a temperatura ambiente su gravedad específica es 13,456 g/mol. Es sumamente volátil, siendo su presión de vapor de  $1,22 \times 10^{-3}$  mm a 20 °C, produce vapores incoloros e inodoros a partir de 13 °C (Morales & Reyes, 2003; Ramírez, 2008). Tiene una elevada tensión superficial y tiene una baja solubilidad en

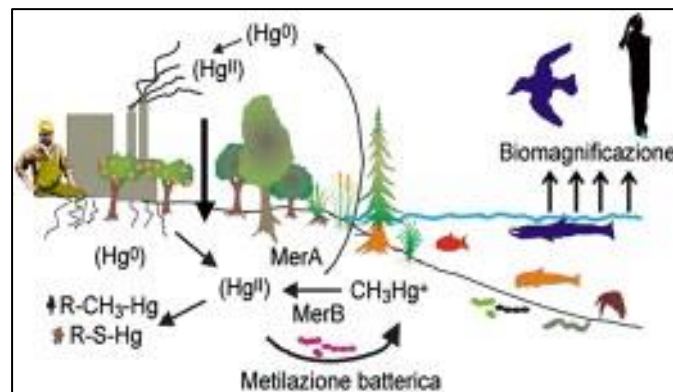


agua. No es un buen conductor de calor, pero sí un buen conductor de corriente eléctrica (Hernández, 2013; Diaz, 2015).

Presenta tres estados de oxidación estables: elemental  $\text{Hg}^0(\text{I})$ , mercurioso  $\text{Hg}_2^{2+}(\text{I})$  y mercúrico  $\text{Hg}^{2+}(\text{II})$ . El estado elemental en la naturaleza es poco frecuente, pero puede originarse a partir de otras formas de Hg. El estado mercurioso rara vez presenta estabilidad en condiciones ambientales normales. En forma iónica puede formar compuestos orgánicos e inorgánicos, así como sulfuros y sulfosales estables (Caiza, 2018).

### 3.5 Ciclo biogeoquímico del mercurio

El ciclo del mercurio está mediado por procesos geológicos y biológicos, ampliamente distribuidos en los que el metal sufre diversas transformaciones físicas. El Hg surge de forma natural del núcleo de la tierra, a través de acciones volcánicas y reside predominantemente en forma de cinabrio ( $\text{HgS}$ ), óxidos de Hg, sulfatos o Hg elemental (Blesa & Castro, 2015). Suele encontrarse en estado gaseoso ya que tiene una presión de vapor muy alta, que lo hace muy volátil. Generalmente, lo podemos encontrar en tres formas, que son  $\text{Hg}^0$ ,  $\text{Hg}_2^{2+}$  y  $\text{Hg}^{2+}$  (Kumari et al., 2020). A través de reacciones de óxido-reducción, estas diferentes formas permanecen en equilibrio, es decir,  $\text{Hg}_2^{2+} \leftrightarrow 4\text{Hg}^0 + \text{Hg}^{2+}$  (Selin, 2009). El Hg volátil ( $\text{Hg}^0$ ) se libera tanto de fuentes artificiales como naturales, se distribuye mundialmente en la atmósfera y cambia a forma iónica ( $\text{Hg}^{2+}$ ) por procesos de oxidación en presencia de luz solar, al reaccionar con ozono y agua (Gustin et al., 2020). El Hg iónico altamente soluble, es condensado por la lluvia y se deposita en la superficie de la tierra, aquí una pequeña fracción del metal oxidado puede unirse a partículas sólidas que son lavadas con la lluvia, para luego ser transportado a sistemas acuáticos por arrastre y por distintos microorganismos, aquí se vuelve a cambiar a su forma metálica ( $\text{Hg}^0$ ) o puede ocurrir la metilación del metal (Figura 1) (Selin, 2009). En el caso del  $\text{Hg}^0$ , se evapora de nuevo a la atmósfera y comienza de nuevo un ciclo nuevo (Kumari et al., 2020). Pero en el caso del metilmercurio formado en los sistemas acuáticos, se bioacumula en la cadena alimentaria acuática y se mueve rápidamente al nivel trófico superior y se biomagnifica (Fitzgerald & Mason, 1996).



**Figura 1.** Ciclo Biogeoquímico del Hg.  
**Fuente:** (Castillo, 2005).

### 3.6 Fuentes de contaminación del mercurio

Existen diversas fuentes de emisión de mercurio al medio ambiente, estas fuentes pueden ser clasificadas como: fuentes naturales y fuentes antropogénicas (Durango et al., 2010).

#### 3.6.1 Fuentes Naturales

Las fuentes naturales pueden incluir volcanes, depósitos naturales de mercurio y volatilización del océano. Como el mercurio es un elemento natural que se encuentra en todo el sistema solar, se encuentra en pequeñas concentraciones en las rocas y es el componente principal del mineral cinabrio. Los incendios forestales y la quema de combustibles fósiles como el carbón y el petróleo también contribuyen a las fuentes naturales de contaminación por mercurio en el medio ambiente. Se ha estimado que la emisión natural de fuentes continentales es de aproximadamente 1000 toneladas al año (Español, 2012).

#### 3.6.2 Fuentes antropogénicas

Las fuentes antropogénicas han aumentado las concentraciones de Hg a nivel mundial, estas proceden principalmente de descargas de la industria hidroeléctrica, minera y de papel. Otros contribuyentes importantes a la reserva mundial de mercurio incluyen la incineración de desechos médicos y municipales, y las emisiones de las centrales eléctricas que utilizan carbón (Dash & Das, 2012). El mercurio emitido al agua o al aire puede viajar largas distancias sin degradarse debido a su alto tiempo de residencia y, por lo tanto, existe una reserva global de mercurio que circula por todo el mundo en un momento determinado. Según algunos modelos recientes sobre el flujo de mercurio a través del medio ambiente, se sugiere que las fuentes antropogénicas representan



aproximadamente el 90% de las 5500-8900 toneladas estimadas de mercurio que se emiten y reemiten actualmente a la atmósfera desde todas las fuentes (Das, 2014).

### 3.7 Mercurio en el suelo

En el último siglo se han emitido a la atmósfera casi 200.000 toneladas de Hg, de los cuales cerca del 95% ha sido depositado en la superficie terrestre, convirtiendo los suelos en el principal depósito de este elemento (Gaona, 2004; Camargo et al., 2014). Una vez depositadas, las especies de mercurio están sujetas a un amplio espectro de reacciones químicas y biológicas. Las condiciones de pH, temperatura y contenidos de sales y componentes orgánicos del suelo favorecen la formación de complejos del ion inorgánico ( $\text{Hg}^{2+}$ ) como  $\text{HgCl}_2$ ,  $\text{Hg}(\text{OH})_2$  o complejos orgánicos (Durango et al., 2010). Aunque los complejos inorgánicos son bastante solubles en agua y, por tanto, de gran movilidad, muchos de ellos forman nuevos complejos con la materia orgánica (principalmente con los ácidos fúlvicos y húmicos) y coloides minerales del suelo o sedimento. Son este tipo de complejos los que principalmente definen el comportamiento del mercurio (Durango et al., 2010; Dang et al., 2019).

Otra de las especies que condicionan la química del mercurio en el suelo y sedimentos es el muy insoluble sulfuro de mercurio. Este compuesto de limitada movilidad, es la principal especie presente en los sedimentos contaminados por mercurio, debido a la reducción del  $\text{Hg}^{2+}$  por parte de bacterias sulfato reductoras bajo condiciones anaeróbicas (Camargo et al., 2014).

Por otro lado, el  $\text{Hg}^{2+}$  presente en los suelos y sedimentos en determinadas condiciones se transforma a metilmercurio por diversos mecanismos, siendo los procesos microbianos el principal (Qiu et al., 2008). Aproximadamente, y según las características de los diferentes suelos y sedimentos, entre el 1 y 3% del mercurio se encuentra como metilmercurio (Arroyave et al., 2019). Las especies inorgánicas restantes se hallan mayoritariamente unidas a compuestos orgánicos (Gaona, 2004).

Tanto el mercurio inorgánico  $\text{Hg}^{2+}$ , como el metilmercurio, forman complejos estables con la materia orgánica del suelo y de los sistemas acuáticos, el metilmercurio constituye solo una pequeña parte de mercurio total en suelo y agua, sin embargo, presenta una alta toxicidad y grado de bioacumulación (Li et al., 2009).



### 3.8 Toxicidad del mercurio en la salud humana

Todas las formas en que se encuentra el mercurio en la naturaleza son tóxicas. El mercurio elemental  $Hg^0$  es el único metal líquido a temperatura ambiente, tiene una alta presión de vapor por lo que existe también en forma gaseosa. En estado gaseoso, el mercurio es directamente absorbido por los pulmones, no se conocen efectos en la piel o el tracto gastrointestinal. Las sales inorgánicas de mercurio ( $Hg^{1+}$  y  $Hg^{2+}$ ) presentan factores de solubilidad y propiedades de absorción disímiles entre ellas, pero en ningún caso se ha reportado toxicidad asociada a absorción por la piel, aunque si se han evidenciado efectos por absorción por los pulmones y el tracto gastrointestinal. Finalmente, para el caso de las formas orgánicas de mercurio, debe anotarse que son las más tóxicas y que son absorbidas por vía dérmica, los pulmones y el tracto gastrointestinal (Liu et al., 2021).

El mercurio mineral es altamente reactivo y su toxicidad se atribuye a la alta afinidad por grupos sulfhidrilos (SH) en los aminoácidos azufrados (cisteínas) en las proteínas de la célula, perturbando las funciones vitales. En el cuerpo, estas sales solubles en agua, no son eficientemente absorbidas, por lo que son eliminadas por la orina, en cuyo proceso afecta severamente al intestino y el sistema renal en casos de envenenamiento (Castillo, 2005; Yang et al., 2020).

El riesgo asociado al mercurio elemental ( $Hg^0$ ) es debido a la alta presión de vapor, anteriormente mencionada, por lo que es fácilmente inhalado. Una vez que es absorbido por los pulmones, el mercurio entra al torrente sanguíneo desde donde es distribuido a todo el organismo, incluyendo el cerebro. El metal es transformado en los eritrocitos, el hígado y el sistema nervioso central a  $Hg^{2+}$  y a metil-mercurio, por lo que la exposición a estos vapores puede resultar en afecciones vasomotoras y del comportamiento (Guzzi et al., 2021).

Las formas orgánicas de mercurio como mono metil, dimetil-mercurio o acetato fenil mercúrico son liposolubles y consecuentemente fácilmente absorbidos por el organismo. Estos compuestos penetran las membranas celulares y atraviesan la barrera sanguínea que protege al cerebro. A nivel celular afectan todos los sistemas de membranas (incluyendo mitocondrias) y, debido a que gran parte es convertido a  $Hg^{2+}$ , también causa daños importantes a todas las proteínas con cisteína en su estructura primaria. Así pues, no hay un cuadro clínico único para estos tipos de envenenamiento ya que los efectos son



diversos, entre los que se cuentan desde desórdenes visuales hasta parálisis e incluso la muerte (Kumari et al., 2020)

Ahora bien, es importante anotar que a pesar de que gran parte del mercurio orgánico se a llevado a un estado mercúrico en las células, este proceso ocurre lentamente, por lo que los síntomas de envenenamiento pueden apareces semanas y hasta meses después de la exposición (Yang et al., 2020).

### **3.9 Biorremediación**

Se define como biorremediación a cualquier proceso que utilice microorganismos, hongos, plantas o las enzimas derivadas de ellos para aumentar la tasa de degradación natural de distintos contaminantes para luego descomponerlos y transformarlos en compuestos más simples poco o nada contaminantes (Cuvi & Bejarano, 2015; Beltrán & Gómez, 2016).

Los procesos de biorremediación presentan ventajas y desventajas, que dependerán de su aplicabilidad en condiciones de campo, es por ello que cuando se logra aislar y caracterizar organismos con capacidad de degradar ciertos contaminantes, lo principal es evaluar la viabilidad de implementar la técnica, ya que, dependiendo el traslado o no del suelo contaminado, las técnicas de biorremediación pueden ser *in situ* o *ex situ* (Garzón & Rodríguez, 2015). La biorremediación *in situ* consiste en tratar los suelos contaminados en el propio de lugar de contaminación sin modificación del medio y la biorremediación *ex situ* implica la excavación o traslado de los suelos contaminados para su posterior tratamiento (Vicien & Paola, 2010).

#### **3.9.1 Biorremediación de Metales Pesados**

Los metales pesados son componentes naturales de la naturaleza por lo que no pueden ser degradados, sino sólo movilizados o inmovilizados para extraerlos desde matrices sólidas o de soluciones, con el fin de darles una disposición final segura. En concentraciones bajas los metales pesados algunas veces son esenciales, mientras que concentraciones altas puede significar un envenenamiento o contaminación del lugar y es aquí cuando se necesita aplicar un tratamiento adecuado (Beltrán & Gómez, 2016).

Las técnicas de biorremediación que involucraron el uso de microorganismos para eliminar contaminantes ambientales han ganado un interés creciente en los últimos años,



porque son efectivas, menos costosas y más eficientes que los métodos fisicoquímicos para eliminar metales pesados (Saranya et al., 2017). La meta de la remediación microbiana de suelos o sedimentos contaminados con metales pesados es inmovilizar el metal *in situ* para reducir la biodisponibilidad, su movilidad o remover el metal del suelo (Yagnentkovsky, 2011).

La exposición a metales pesados tóxicos hace que las células de los microorganismos desarrollen mecanismos de resistencia (Silva et al., 2012; Kotwal et al., 2018). Dado que los iones de metales pesados no se pueden degradar ni modificar, existen pocos mecanismos de resistencia que pueden remover metales pesados, estos mecanismos pueden ser: la unión de metales a la superficie celular, la bioacumulación, la detoxificación de metales tóxicos a formas menos tóxicas, el uso de la proteína metalotioneína, y la combinación de estos. La mayoría de estos procesos son transformaciones enzimáticas de los metales que incluyen la oxidación, la reducción, la metilación, la desmetilación; las cuales pueden dar como resultado, compuestos poco solubles en agua o bien compuestos volátiles (Marrero et al, 2010).

### 3.9.2 Biorremediación de Hg

En el caso particular del Hg los procesos de biorremediación, consisten principalmente en el uso de bacterias, que mediante mecanismos de reducción y volatilización consiguen detoxificar el mercurio inorgánico  $Hg^{2+}$  transformándolo en mercurio mineral  $Hg^0$  (Essa et al., 2002; Mahbub et al., 2017). Además, se han reportado biopelículas bacterianas capaces de adsorber Hg (Wagner-Dobler, 2003).

En ambientes contaminados con Hg debido a su exposición prolongada, ciertas cepas de bacterias han adquirido una resistencia muy específica a compuestos inorgánicos de mercurio y a compuestos organomercuriales. En este sentido, se ha demostrado que muchas especies bacterianas desarrollan resistencia al Hg y a otros metales pesados, por ejemplo las *Pseudomonas*, *Proteus*, *Xanthomonas*, *Alteromonas*, *Aeromonas*, y *Enterobacteriaceae* (Mahbub et al., 2017; Paisio et al., 2017).

El mecanismo de resistencia más estudiado para este metal se basa en la presencia de grupos de genes organizados en un único operón, denominado “operón *mer*”, que permite la detoxificación enzimática del metal (Kotwal et al., 2018). La estructura del operón *mer* varía entre las distintas especies bacterianas, encontrándose dos tipos de



operones: de espectro reducido (*mer A*) que presenta resistencia a Hg inorgánico, y de espectro amplio (*mer B*) el cual confiere resistencia a Hg inorgánico y orgánico (Dash & Das, 2012).

Las bases bioquímicas de la resistencia a compuestos inorgánicos de mercurio como el  $\text{HgCl}_2$  se basa en la reducción enzimática, que es llevada a cabo por la enzima mercurio reductasa (*mer A*) (Guerrero & Gárate, 2013). Esta enzima es una flavoproteína que cataliza la transferencia de electrones de NADPH al  $\text{Hg}^{2+}$  para reducirlo a su forma mineral  $\text{Hg}^0$  en la cual, dada su alta presión de vapor, es volatilizado dejando el ambiente libre del contaminante (De et al., 2014).

Los iones  $\text{Hg}^{2+}$  se transportan desde el exterior de la célula hacia el interior a través de varios transportadores de proteínas (Paisio et al., 2017). En el periplasma de la célula se encuentra una proteína transportadora, *mer P*, con un par de residuos de cisteína que unen los iones  $\text{Hg}^{2+}$ , para luego transferirlos a otro par de residuos de cisteína en la proteína *mer T*, ubicada en la membrana citoplasmática, que finalmente va a transferir los iones al sitio activo de *mer A*, en la cual ocurre la reducción del metal a la forma mineral (Barkay et al., 2003; De et al., 2014).

Por otro lado, el proceso bioquímico de resistencia contra los compuestos organomercuriales es más complejo. El compuesto organomercurial es transportado dentro del citoplasma, y durante este proceso el enlace entre el carbono y el Hg es digerido por la enzima organomercurial liasa codificada por el *mer B* para producir  $\text{Hg}^{2+}$ , a partir de aquí actúa la enzima mercurio reductasa, que transforma el  $\text{Hg}^{2+}$  en Hg elemental (De et al., 2014)

Por los problemas que representa el Hg volatilizado, se ha desarrollado un método adicional de biorremediación, que requiere la acumulación de Hg volatilizado. Esta bioacumulación se puede dar de dos formas: a) La bioacumulación de Hg volatilizado en el citoplasma de las células que contienen el operón *mer*; y b) La bioacumulación de Hg mediante adsorción en biopelículas, que consiste en la utilización de biomasa microbiana viva o muerta de bacterias, hongos o algas para la bioabsorción de  $\text{Hg}^0$  volatilizado para restringir su reexposición a la atmósfera (Ahluwalia & Goyal, 2007; Diep et al., 2018; Mahbub et al., 2017).





### 3.10 Bacterias

Las bacterias son organismos unicelulares procariotas; es decir que carecen de núcleo celular y de orgánulos como las mitocondrias, cloroplastos o aparato de Golgi, por lo que su material genético (ADN) se encuentra libre en el citoplasma. Las bacterias miden entre 0,2 a 2  $\mu\text{m}$  de diámetro y tienen una longitud de entre 0.4 a 5  $\mu\text{m}$ , es imposible verlas a simple vista, excepto cuando se agrupan en colonias (Sánchez et al., 2018). A pesar de su sencilla organización celular, presentan una gran diversidad de formas, que se pueden clasificar como: cocos, bacilos, vibrios y espirilos (Granados Pérez & Carmen, 2017).

Estos microorganismos cuentan con una pared que envuelve a la célula y le proporciona solidez y protección contra el ambiente externo. Están recubiertas de una pared celular, una estructura que está por encima de la membrana celular y que da rigidez, protege y permite una comunicación entre la bacteria y el medio que la rodea. Se las puede encontrar en cualquier ambiente ya que, a diferencia de la gran mayoría de los organismos superiores, las bacterias pueden soportar condiciones ambientales cambiantes e impredecibles, y en muchas ocasiones extremas (Hidalgo, 2008).

### 3.11 Crecimiento microbiano

El crecimiento microbiano es el aumento poblacional de una especie microbiana en un medio de cultivo que contiene los requerimientos de los microorganismos, como nutrientes, temperatura, humedad y pH (Granados Pérez & Carmen, 2017). El crecimiento microbiano se puede representar mediante una curva de crecimiento, esta curva de crecimiento es distinta según el tipo de microorganismo, sin embargo, la mayoría presenta las siguientes fases: 1) la fase de latencia o fase de crecimiento lento, corresponde a la primera parte de la curva, aquí las bacterias se adaptan a nuevos entornos con sus diferentes nutrientes; 2) la fase logarítmica o fase exponencial, fase en la que las bacterias se han adaptado al nuevo entorno y comienzan a multiplicarse con rapidez; 3) la fase estacionaria, que es la fase en la que la población no aumenta porque las bacterias comienzan a dejar de dividirse; y 4) la fase de declinación o muerte, en esta fase las bacterias células bacterianas comienzan a morir y no se produce una adición de nuevas células (Ekyastuti & Setyawati, 2015).



### **3.12 Identificación bacteriana**

#### **3.12.1 Características microscópicas.**

Ciertas características de las bacterias como la forma, tamaño, bordes y la forma de agruparse, se suelen analizar mediante un estudio microscópico luego de realizar una tinción. Las tinciones más utilizadas son la de azul de metileno y la de Gram (Bou et al., 2011)

Luego de realizar la tinción y con ayuda del microscopio se puede distinguir características propias de cada bacteria, por ejemplo:

- Forma: cocos, bacilos, cocobacilos, filamentosos, etc.
- Tamaño: pequeñas o grandes
- Bordes que presenta: abultados, paralelos, cóncavos, irregulares, etc.
- Extremos: redondeados o puntiagudos.
- Disposición: en parejas, cadenas, racimos, tétradas, etc.

#### **3.12.2 Características macroscópicas**

Las características macroscópicas están determinadas por la morfología de cada colonia. La morfología se suele determinar en colonias de cultivos frescos que han crecido en medios de cultivo no selectivos, y sirve para tener una idea del tipo de microorganismo en estudio o para diferenciar un microorganismo de otro. La morfología se analiza en colonias de una sola especie, y las características principales a analizar son: tamaño, forma, borde, textura, y a veces su color (Pérez & Mota, 2008).

#### **3.12.3 Tinción de Gram**

La pared celular de las bacterias está compuesta por peptidoglicano, que es un polímero complejo de aminoazúcares y diferentes tipos de proteínas, dependiendo del tipo de bacteria pueden además encontrarse lípidos, polisacáridos y otros componentes ácidos, lipoprotéicos y lipopolisacáridos; dicha composición de la pared es utilizada para diferenciar dos tipos de bacterias, de acuerdo a su respuesta a la tinción según demostró el científico danés Gram de donde se reconocen las bacterias Gram positivas y las Gram negativas (Rodríguez et al., 2005). Las Gram positivas no se lavan con etanol, retienen el colorante violeta y se observan de dicho color, presentan una pared formada por una capa homogénea y espesa de peptidoglicano, polisacáridos y poco o ningún lípido;



mientras que las Gram negativas se decoloran cuando se lavan con etanol, no retienen el colorante violeta y se observan rosadas, su pared está formada por una capa delgada de peptidoglicano y otra externa con lipoproteínas y polisacáridos (Gobernado & López-Hontangas, 2003).

#### **3.12.4 Prueba de la oxidasa**

La prueba de la oxidasa sirve para identificar aquellas bacterias que presentan la enzima citocromo c oxidasa. Esta enzima interviene en la respiración aerobia, ya que pertenecen a una cadena de transporte de electrones de oxígeno, y formación de agua. Por esta misma razón este citocromo oxidasa lo podemos encontrar en organismos aerobios, y en ciertos anaerobios facultativos (Bou et al., 2011). El reactivo que se recomienda usar para esta prueba es el reactivo de Kovacs, que consiste en una solución acuosa al 1% de diclorhidrato de tetrametil-p-fenilendiamina; este reactivo consiste en teñir las colonias de bacterias con un color violeta, un resultado positivo se verá reflejado en un viraje gradual a púrpura negruzco en los primeros 20 segundos. Un resultado positivo sirve para identificar las especies de *Neisseria*, además esta prueba sirve para identificar *Pseudomonas* de los miembros oxidasa negativos de las enterobacterias (Callicó et al., 2004).

#### **3.12.5 Prueba de la catalasa**

La enzima catalasa está contenida en la mayoría de bacterias aerobias, aunque también la poseen ciertas bacterias anaerobias facultativas, que contienen el citocromo oxidasa. La prueba es fácil de realizar, y es positiva cuando al añadir una muestra de bacterias sobre una gota de peróxido de hidrógeno (10 volúmenes) se produce una efervescencia muy rápida y se desprenden burbujas; lo que pasa en realidad es que la enzima catalasa transforma el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular (Guzmán, 2016).

La prueba de la catalasa se utiliza para diferenciar las bacterias *Micrococcus* y *Staphylococcus* (resultado positivo), de las *Streptococcus* (resultado negativo) (Guzmán, 2016).

#### **3.12.6 Agar MacConkey**

Este medio de cultivo sirve para el desarrollo de bacterias Gram negativas. La importancia principal de este medio recae, en la identificación de bacterias fermentadoras y no fermentadoras de lactosa. Aquellas bacterias que fermentan lactosa desarrollan colonias de color rosado; mientras que las bacterias que no fermentan lactosa presentan colonias

incoloras o transparentes. Este medio se utiliza para identificar bacterias Gram negativas de la familia *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas sp*, *Aeromonas sp*, *Plesiomonas sp*, entre otras (Fernández et al., 2010).

### 3.12.7 Agar King A y King B

Estos medios de cultivo sirven para identificar a ciertas bacterias no fermentadoras, que producen compuestos pigmentados. Normalmente se utiliza para identificar a *Pseudomonas aeruginosas*, ya que estas producen un pigmento amarillo fluorescente (fluoresceína o pioverdina) cuando son inoculadas sobre el agar King B, y un pigmento azul (piocianina) cuando son sembradas sobre el agar King A. Lo que ocurre en esta prueba es que la composición de sales tanto del agar King A como del Agar King B se ve reflejada en la producción de uno de los dos pigmentos inhibiendo la producción del otro (Callicó et al., 2004).

### 3.13 ESTADO DEL ARTE

La minería artesanal durante años ha causado fuertes impactos en los ecosistemas y en la salud de las personas alrededor de todo el mundo, principalmente por el uso de mercurio en la separación del oro de otros metales (Español, 2012; Osore et al., 2012; López et al., 2016). En nuestro país pese a que se ha querido legalizar y regularizar este tipo de minería, ésta aún sigue presente; así lo demuestra Jara (2012), quién en su trabajo menciona una serie de autores que han registrado efectos negativos en el agua, suelo, aire, alimentos, especies vegetales, especies de fauna y en la salud humana, en diferentes zonas mineras de nuestro país (Tabla 1).

**Tabla 1. Factores del ecosistema afectados por la minería en diferentes investigaciones.**

AUTOR	LUGAR	TIPO DE MINERIA	Factores afectados de los ecosistemas que se han estudiado						
			Agua	Suelo	Aire	Alimentos	Especies vegetales	Especies de fauna	Salud humana
Appleton, et al, 1996	Ponce Enriquez	Artesanal			x				
PRODEMINCA, 1998	Ponce Enriquez, Zaruma-Portovelo, Santa Rosa y Nambija	Artesanal y pequeña escala	x	x				peces, crustáceos e insectos	



Appleton, et al, 2000	Ponce Enriquez, Portovelo-Zaruma y Nambija	Artesanal	x						
Betancourt, 2001	Cuenca hidrografica del río Puyango	Artesanal y pequeña escala						peces	x
Counter, et al, 2002	Nambija y Portovelo	Artesanal							x
Valarezo y Rosero, 2004	Zaruma, Portovelo y Ponce Enriquez	Artesanal	x	x	x	x	x	peces	
Betancourt, et al, 2005	Cuenca hidrografica del río Puyango	Artesanal y pequeña escala	x						x
Guerrero, 2009	Páramos del país	Todo tipo	x	x					
Velástegui, 2010	Páramos del país	Todo tipo							
Rhon-Dávila, J. 2010	Portovelo y Zaruma	Artesanal y pequeña escala	x	x	x				
Carrillo y Astudillo, 2011	Ponce Enriquez	Artesanal			x				
Betancourt, et al, 2012	Cuenca hidrografica del río Puyango	Artesanal y pequeña escala	x						x

**Fuente:** (Jara, 2012).

En las minerías artesanales y a pequeña escala para poder recuperar el oro de la mena (material rocoso que contiene oro), se mezcla mercurio inorgánico con la mena, posterior



a ello se lava esta mezcla con el fin de recuperar sólo la amalgama que forma el Hg con el oro, esta amalgama luego se somete a altas temperaturas, lo que hace que el Hg se evapore y quede el oro; el vapor de mercurio se esparce contaminando el aire, y luego se precipita en el suelo o en el agua; afectando a microorganismos, animales, plantas y seres humanos que dependen de estos ecosistemas (García et al., 2002). Además, los relaves que se producen de la molienda y del lavado de la amalgama son depositados en suelos agrícolas, o simplemente son arrojados a las fuentes de agua más cercanas, haciendo que la contaminación aumente en estos ecosistemas (Rubiano, 2018).

Debido a que los tratamientos físico-químicos para tratar el mercurio implican grandes cantidades de dinero y muchas veces no se tienen los resultados esperados, cada vez la investigación de técnicas de biorremediación de este metal va tomando mayor importancia, es así que a nivel mundial han surgido diferentes estudios que utilizan microorganismos, principalmente bacterias, para la remediación de suelos contaminados con Hg (Garzón & Rodríguez, 2015; Pinzón & Fajardo, 2018).

A nivel mundial la biorremediación del mercurio en industrias mineras, comenzó a inicios de 1980 en Estados Unidos y Canadá, con la implementación de plantas de tratamiento de metales pesados. En estas plantas se realiza un tratamiento biológico aeróbico para la remoción de mercurio y otros contaminantes como el cianuro, tiocianato, cianato, amoníaco antes de ser descargado el efluente (Vicien & Paola, 2010).

Actualmente el mecanismo más utilizado para el tratamiento de Hg se basa en la aplicación de grupos de bacterias con genes organizados en un único operón, denominado “operón *mer*”, que favorecen la detoxificación enzimática del metal, transformándolo de formas tóxicas a formas menos tóxicas volátiles (Hernández, 2013; Dash et al., 2014). En su trabajo de investigación Paisio et al. (2017) recopila diferentes estudios en donde se da a conocer algunos microorganismos (principalmente bacterias) que presentan el sistema operón como medio de reducción de Hg, y que son capaces de remover distintos compuestos de Hg de ambientes contaminados (Tabla 2).

**Tabla 2. Diferentes microorganismos (bacterias, hongos y algas) implicados en la remoción de Hg y compuestos derivados.**

Microorganismos	Compuesto	Referencia
<i>Pseudomonas</i> , <i>Psychrobacter</i>	Hg orgánico e inorgánico	Pepi et al. (2011)
<i>P. balearica</i>	MeHg	Lee et al. (2012)
<i>P. putida VI</i>	MeHg	Cabral et al. (2013)
<i>P. fluorescens</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Citrobacter braakii</i> y <i>Alcaligenes faecalis</i>	MeHg	Adelaja y Keenan (2012)
<i>Pseudomonas</i>	Hg(II)	Wagner-Döbler (2003)
<i>P. putida spi3</i>	Tiomersal	Fortunato et al. (2005)
<i>Enterobacter sp.</i>	Hg(II)	Sinha y Khare (2012)
Conjunto de bacterias y algas	Hg(II)	Malakahmad et al. (2011)
<i>Bacillus cereus</i>	Hg(II)	Sinha et al. (2012)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Hg(II), MeHg y etilmercurio	Saglam et al. (1999)
<i>Lentinus edodes</i>	Hg(II)	Bayramoglu et al. (2008)
Hongos micorrízicos	Hg	Crane et al. (2010)
<i>Trichoderma</i>	Hg	Raspanti et al. (2009)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> , <i>Chlorella emersonii</i>	Hg(II)	Bayramoğlu et al. (2008)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> 2AMT-2, transgénica	Hg(II)	He et al. (2011)
<i>Chlorella sp. DT</i> transgénica	Hg(II)	Huang et al. (2006)

**Fuente:** (Paisio et al., 2017).

Para poder capturar el Hg volátil, se han estudiado diferentes métodos de bioacumulación, por ejemplo, se ha demostrado que las bacterias que presentan el sistema operón *mer* como medio de detoxificación de Hg, también pueden bioacumular Hg en medios controlados, así lo demuestra Diep et al. (2018), que en su trabajo de investigación da a conocer una serie de publicaciones que muestran la capacidad de ciertas bacterias, principalmente *Escherichia coli*, de acumular compuestos de mercurio. Otro sistema de acumulación de Hg es la biosorción, es por ello, que en los últimos años se han realizado diferentes estudios en donde el porcentaje de bioacumulación es elevado (He et al., 2011; Zhang et al., 2012; Baldi et al., 2012).



En Latinoamérica se han realizado varios estudios para identificar especies de organismos resistentes al Hg, que tengan capacidad de remover este contaminante de diferentes medios de vida. Por ejemplo, en Sincelejo (Colombia) se demostró que la especie vegetal Guarumo, después de 4 meses de crecimiento, es capaz de remover entre el 15.7% y 33.7% del Hg de suelos contaminados (Durango et al., 2010). En otro estudio realizado en Bogotá, se evidenció que seis cepas de hongos acuáticos son capaces de remover hasta un 60% del Hg procedente de efluentes líquidos de minerías artesanales (Vera, 2016). En Lima (Perú) se evidenció la resistencia a Hg de 41 cepas de *Escherichia coli* aisladas de aguas superficiales marinas, las cuales presentaron concentraciones mínimas inhibitorias entre 30  $\mu\text{M}$  (8.25 ppm) y 300  $\mu\text{M}$  (82.5 ppm) (Sulca & Alvarado, 2018). En la Universidad Interamericana ubicada en Puerto Rico se desarrollaron *E. coli* transgénicas capaces de absorber en cinco días el 80% del mercurio contenido en un medio líquido, estas bacterias acumularon hasta  $100.2 \pm 17.6 \mu\text{M}$  de Hg en medios que contenían 120  $\mu\text{M}$  (Ruiz et al., 2011). Por otra parte, en una investigación realizada en Brasil se demostró que un grupo de *Pseudomonas sp.* es capaz de remover hasta un 95% de mercurio en un medio de cultivo y hasta un 85% de mercurio en efluentes contaminados con este metal (Giovannella et al., 2017). De igual forma, un estudio realizado en El Callao (Venezuela) se aislaron 190 cepas bacterias tanto de *E. coli* como de *Pseudomonas aeruginosa*, las mismas que presentaron un amplio rango de niveles de resistencia a concentraciones de  $\text{Hg}^{2+}$  ya que algunas pudieron crecer en medio líquido a 25  $\mu\text{M}$  de  $\text{Hg}^{2+}$  mientras que otras crecieron a 300  $\mu\text{M}$  de  $\text{Hg}^{2+}$  (Ball et al., 2007).

En Ecuador las investigaciones sobre biorremediación de Hg aún son escasas, y las pocas que existen son principalmente utilizando especies vegetales (fitorremediación). Por ejemplo, en un estudio realizado en La Escuela Superior Politécnica de Chimborazo se demostró que las especies vegetales *Arachis pintoi* W.C (maní forrajero) *Cecropia peltata* L (guarumo) luego de 4 meses de crecimiento pueden remover entre 36.90% y 52.62% del Hg presente en suelos contaminados (Muñoz, 2017). En otro estudio realizado en suelos contaminados por minería aurífera en las riveras del Rio Nambina (Zamora) se pudo evidenciar que luego de 3 meses de crecimiento, la especie vegetal *Arachis pintoi* W.C (maní forrajero) pudo remover 42mg/kg de Hg de una muestra de suelo con una concentración inicial de 174mg/kg Hg (Galo & León, 2016).

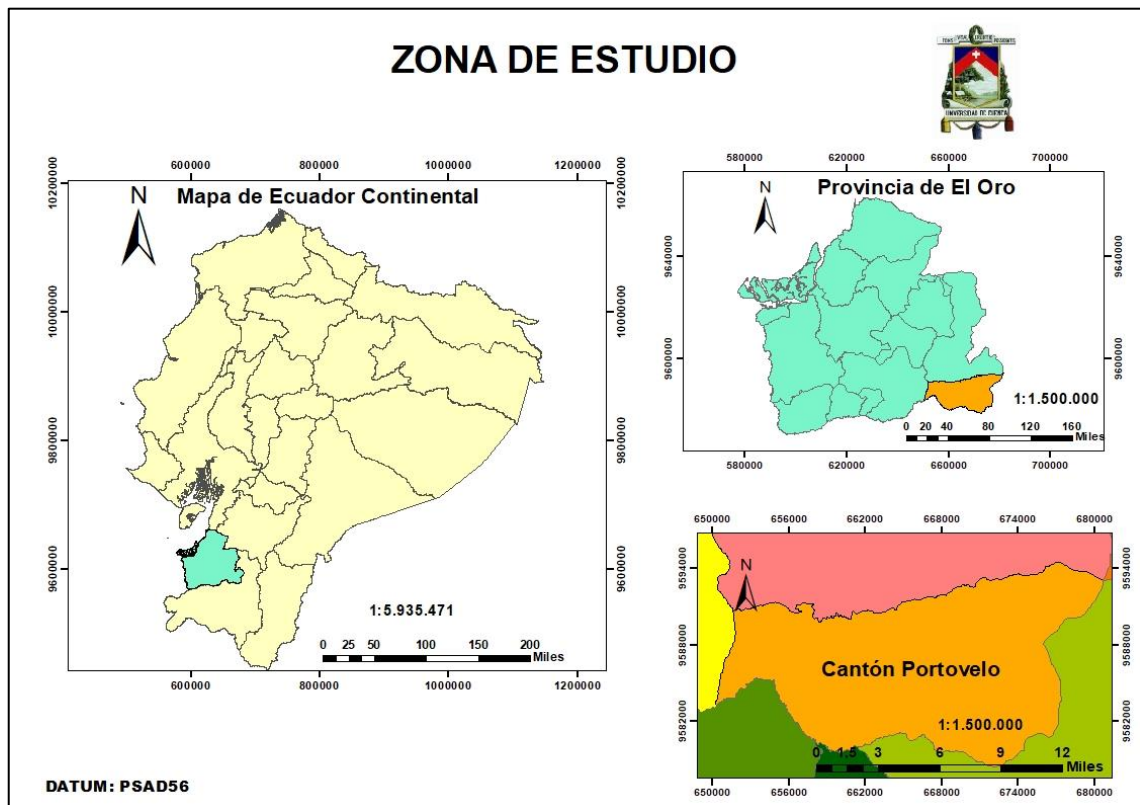


## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Área de estudio

Las muestras de suelo fueron tomadas de diferentes zonas mineras del cantón Portovelo (Figura 2), este cantón pertenece a la provincia de El Oro, y se encuentra ubicado al extremo suroeste de la República del Ecuador, a 105 Km de la ciudad de Machala, con una extensión de 286,20 Km<sup>2</sup> (López et al., 2016).

El cantón Portovelo cuenta con 13284 habitantes. Este cantón se encuentra entre los 560 y 3600 m s.n.m, presenta dos estaciones marcadas que son: el verano, que cubre los meses de junio a noviembre y el invierno, que se da entre los meses de diciembre y mayo (GAD de Portovelo, 2014). El clima es cálido húmedo, teniendo en las zonas altas temperaturas de 5 a 15°C y en las zonas bajas la temperatura fluctúa entre los 21 a 28°C; por otro lado, la humedad fluctúa entre el 40 al 50%. La precipitación mínima mensual es de 118 mm y la máxima 125 mm (Oviedo et al., 2017).



**Figura 2.** Mapa del Cantón Portovelo.

**Fuente:** ODEPLAN 2002.

**Elaboración:** El autor.

Según López et al., (2016), aún existe la utilización de Hg para la separación de oro en



algunas zonas mineras de Portovelo; estas concentraciones llegan al suelo debido a las corrientes acuosas que salen de los molinos de amalgamación y de la quema del mercurio, es por ello que se seleccionó esta área de estudio para la toma de muestras.

#### 4.2 Toma de muestras

En primera instancia se tomaron dos muestras de suelo de dos puntos diferentes en zonas cercanas a minerías, sin embargo, no se detectó Hg en estas muestras (Anexo 1), por lo que fue necesario ingresar a los sitios donde se encontraban áreas mineras a tomar nuevas muestras. De tal modo que luego de recorrer diferentes zonas mineras, se eligieron tres puntos en concreto para la toma de tres muestras de suelo (una por cada punto) (Figura 3), esta elección se hizo tras haber constatado la utilización de Hg para la separación de oro en estos puntos, y luego de haber obtenido el consentimiento de los propietarios de los terrenos para ingresar a la toma de muestras. Las tres muestras se tomaron de suelos pertenecientes a antiguas relaveras, que ya habían cumplido su tiempo de vida útil hace muchos años atrás. Las coordenadas de los puntos de donde se tomaron las muestras se presentan en la Tabla 3:

**Tabla 3. Coordenadas de los puntos de muestreo en el sistema UTM.**

PUNTOS	Coordenadas en X	Coordenadas en Y	Código de Muestra
Punto 1	653853.13	9589915.63	M1
Punto 2	654501.43	9589641.51	M2
Punto 3	654550.32	9589537.24	M3

**Elaboración:** El autor.

Los tres puntos de muestreo están ubicados al Este del cantón Portovelo, prácticamente en sus periferias, y se encuentran relativamente cerca uno de otro. El consentimiento de los propietarios de los terrenos para acceder a los mismos fue el obstáculo más grande a la hora de seleccionar los puntos de muestreo.



**Figura 3.** Puntos de muestreo.

**Fuente:** Google Earth.

**Elaboración:** El autor.

En cada punto, se tomó una muestra compuesta de 500 g de suelo, para ello, con la ayuda de un palín se tomó 10 submuestras de aproximadamente 50 gramos cada una, las cuales fueron homogenizadas en un recipiente de plástico; una vez tomadas las tres muestras (una por cada punto) se procedió a colocarlas en una nueva bolsa plástica, las mismas que fueron selladas y rotuladas con su código de muestreo (Punto 1, M1; Punto 2, M2; y Punto 3, M3) (Tabla 3), fecha, coordenadas y una observación general del lugar (Osorio, 2012).

Para obtener una muestra compuesta representativa de los tres puntos, las 10 submuestras de suelo fueron tomadas al azar en una extensión de aproximadamente una hectárea. La recolección de las muestras de suelo fue superficial, es decir no mayor a una profundidad de 20 cm (horizonte A), en sitios donde no existía cobertura vegetal, tal y como se recomienda para metales pesados (Paternina et al., 2017). El pH en estos suelos es ácido, y la textura del suelo en su mayoría es arcillo arenoso (GAD de Portovelo, 2014).

Debido a la distancia desde los puntos de muestreo al lugar de tratamiento de las muestras, fue necesario almacenarlas en un lugar fresco, en este caso se utilizó una hielera, con el fin de evitar pérdida de humedad, modificaciones de temperatura, o alguna otra alteración del entorno natural del suelo que pueda afectar el aislamiento de las bacterias o la determinación de Hg en el suelo (Lozano et al., 2004).



Las muestras recolectadas fueron llevadas al laboratorio de Análisis de la Calidad del Agua, de la Universidad de Cuenca, *campus* de Balzay, en Cuenca. Aquí, las muestras fueron tratadas y conservadas para su posterior utilización en el aislamiento de bacterias resistentes al mercurio.

#### **4.3 Determinación de la concentración mercurio en las muestras de suelo**

Las tres muestras de suelo fueron tamizadas a través de una malla de 2 mm, con el fin de recoger la fracción tamizada de suelo, y evitar la presencia de raíces, ramas u otros componentes que puedan interferir en el proceso de análisis de Hg (Toledo & Vicedo, 2017).

Luego de tener las tres muestras de suelo uniformes, se pesaron 100g de cada muestra y se colocaron en una bolsa plástica, las mismas que fueron selladas y rotuladas, para ser enviadas al laboratorio de análisis de agua ANAVANLAB, ubicado en la ciudad de Quito, en donde se determinó la concentración de Hg presente en la muestra. En este laboratorio, primero se realizó una digestión de las muestras, con el fin de poner en disolución el ion metálico que se quiere analizar; la digestión se realizó tomando 1 g de cada muestra de suelo. Con las muestras digeridas se utiliza la técnica de medición de la concentración de mercurio mediante vapor frío, la cual consiste en reducir el mercurio en forma iónica ( $\text{Hg}^{2+}$ ) a su estado metálico ( $\text{Hg}^0$ ), para que de esta forma y mediante un espectrómetro de luz visible, se determine las concentraciones de mercurio presentes en cada muestra de suelo (Ruiz, 2016).

Las unidades reportadas por el laboratorio de la concentración de Hg de cada muestra fueron en partes por millón (ppm). Para poder comparar con la normativa de calidad de suelos, las unidades fueron cambiadas a mg/kg, sin embargo, de acuerdo al método de medición de la concentración Hg utilizado en el laboratorio, los valores de la concentración de Hg son los mismos en ppm y mg/kg.

En este laboratorio, el rango de detección de Hg es de 0,005 ppm hasta 10 ppm, dentro de este rango los resultados son seguros y confiables, sin embargo, valores fuera de este rango están sujetos a un error. Es así que para valores superiores a 10 ppm el laboratorio reporta un porcentaje de incertidumbre de 30%, mientras que para valores menores a 0,005 ppm el porcentaje de incertidumbre reportado es de 20%.



#### 4.4 Cultivo, selección y aislamiento de las bacterias resistentes a mercurio

De acuerdo a diferentes estudios en los cuales se aislaron microorganismos resistentes a metales pesados (Ber et al., 2003; Santos-Domínguez et al., 2017; Sulca & Alvarado, 2018), dos medios de cultivo sólidos fueron seleccionados para favorecer el crecimiento de los microorganismos presentes en las muestras de suelo, estos medios de cultivo fueron: a) Agar MacConkey (Anexo 2); y b) Agar Sabouraud Dextrose (Anexo 3).

A estos dos medios de cultivo se les agregó diferentes concentraciones de cloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ), con el fin de determinar si las bacterias presentes en el suelo podían crecer en presencia de este contaminante. Es así que, tanto el agar MacConkey como el agar Sabouraud Dextrose fueron preparados agregando concentraciones de 0; 50; y 100 ppm de  $\text{HgCl}_2$ , el primero como control positivo, es decir, para verificar que efectivamente habían microorganismos en las muestras de suelo (Vera, 2016).

Para las tres muestras de suelo (M1, M2 y M3) se siguió el mismo procedimiento de siembra, selección y aislamiento de bacterias. De este modo, primero, se agregó 1 g de suelo en un tubo de ensayo junto con 9 ml de agua, se homogenizó ligeramente en un agitador vórtex durante un minuto, y a partir de esta solución se realizaron diluciones de v/v en serie, hasta la dilución  $10^{-3}$ , esto con el fin de poder aislar fácilmente las bacterias, ya que es más fácil detectar colonias de microorganismos a medida que aumentan las diluciones. Posteriormente, se procedió a sembrar 0,1 ml de cada dilución en placas Petri que contenían los dos medios de cultivo (Mac Conkey y Sabouraud Dextrose) con sus diferentes concentraciones de  $\text{HgCl}_2$ , mediante la técnica de extensión en superficie. Los cultivos fueron incubados a una temperatura de  $20^\circ\text{C}$  por 5 días.

Luego de 5 días se evidenció visualmente el crecimiento de microorganismos en ciertas placas, mientras que en otras no se pudo evidenciar desarrollo de microorganismos. De las placas que presentaron desarrollo de microorganismos, se seleccionaron a las morfoespecies dominantes, las cuales fueron inoculadas por estriado en nuevas placas Petri con los mismos medios y a las mismas concentraciones de  $\text{HgCl}_2$ , estos medios fueron incubados a la misma temperatura ( $20^\circ\text{C}$ ) por 5 días. Este procedimiento de siembra y resiembra se repitió algunas veces hasta que se llegaron a obtener cultivos puros con dos únicas cepas de bacterias (Vera, 2016), a las cuales se les asignó el código de aislamiento: BA y BN.



#### 4.4.1 Cinética de crecimiento Bacteriano

Para determinar la cinética de crecimiento bacteriano, primero se analizó la capacidad de las cepas aisladas para crecer en medio líquido. Con la ayuda de un asa bacteriológica estéril se tomó una pequeña muestra de cada cepa y se sembró en 20 ml de caldo Lisogenia a 20°C (Anexo 4), el cual contenía concentraciones de 0; 50; y 100 ppm de HgCl<sub>2</sub>. Este medio de cultivo líquido, es nutricionalmente rico, utilizado principalmente en el cultivo de bacterias (Irawati et al., 2012)

Trascurrido el tiempo de incubación (2 días) y al notar crecimiento bacteriano de las dos cepas en los caldos de cultivo, se procedió a determinar la cinética de crecimiento bacteriano, para ello, se realizaron diluciones en serie (v/v) hasta 10<sup>-5</sup> de cada uno de los medios. De estas diluciones se agregó 0,1 ml nuevamente en los medios sólidos MacConkey (diluciones con la cepa BA) y Sabouraud Dextrose (diluciones con la cepa BN), los mismos que contenían las mismas concentraciones en las cuales se desarrollaron los aislados en el caldo Lisogenia, es decir 0; 50; y 100 ppm de HgCl<sub>2</sub>. Se analizó el desarrollo de colonias por 10 días manteniendo las placas a 25°C.

Para la determinación de la concentración microbiana, se realizó un recuento directo en placas Petri (medios sólidos), sin el uso de un microscopio óptico, puesto que las colonias tenían un tamaño considerable, lo que permitía contarlas a simple vista; este conteo consiste en contar una a una las colonias perfectamente formadas en placas y luego estimar su cantidad final de acuerdo a la dilución en la que se trabajó.

En este procedimiento se realizaron dos réplicas, y el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) se llevó a cabo en la dilución v/v 10<sup>-5</sup> para las bacterias que fueron sembradas en concentraciones de 0; y 50 ppm de HgCl<sub>2</sub>, mientras que las bacterias que fueron sembradas en 100 ppm de HgCl<sub>2</sub> fueron contadas en la dilución v/v 10<sup>-4</sup>. Con los valores obtenidos en cada placa la estimación de la capacidad de crecimiento de cada cepa, se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{UFC}}{\text{ml}} = \frac{(\# \text{ de Colonias por placa} \times \text{Inversa de la dilución})}{\text{ml de la muestra sembrada}}$$



Para poder realizar la curva de crecimiento bacteriano, se recomienda registrar los datos cada día del aumento del número de colonias, sin embargo, debido a la disponibilidad del laboratorio donde se trabajó, los valores fueron registrados sólo en los días 2, 5,7 y 10.

#### **4.4.2 Identificación Bacteriana**

A las dos cepas que pudieron resistir las distintas concentraciones de  $HgCl_2$ , se les realizó una identificación a nivel fenotípica, analizando sus características microscópicas y macroscópicas, además, se realizaron pruebas bioquímicas que se tenían a disposición en el laboratorio con el fin de tener una idea de la familia de bacterias en cuestión.

Las características macroscópicas de las colonias, se analizaron al sembrar las dos cepas en agar Sabourad Dextrose durante 24 horas a  $35^{\circ}C$ . Por otro lado, las características microscópicas se analizaron observando a los microorganismos a través del microscopio.

Las pruebas bioquímicas a las dos cepas de bacterias comenzaron con la prueba de tinción Gram, un color rosado en esta prueba nos indica que las bacterias son Gram (-), mientras que un color púrpura nos indica que las bacterias son Gram (+).

Posteriormente se analizó la presencia de la enzima oxidasa, evaluando la aparición de un color violeta o purpura (oxidasa positiva) al exponer las colonias al reactivo de oxidasa. De igual manera, se analizó la presencia de la enzima catalasa, para ello se agregó peróxido de hidrógeno sobre una muestra de las cepas de bacterias, la aparición de un burbujeo o efervescencia nos indica que la prueba es positiva.

También, se analizó el crecimiento de colonias en agar MacConckey con el fin de determinar si las bacterias eran fermentadoras de lactosa o no, un cambio de color en las colonias a rosado nos indica que las bacterias no son fermentadoras de lactosa.

Finalmente, se analizó el crecimiento de las bacterias en medio King A y King B, con el fin de identificar pigmentos amarillos y azules respectivamente (Callicó et al., 2004).

#### **4.5 Determinación de la capacidad para remover mercurio de las bacterias seleccionadas.**

Para conocer si las bacterias aisladas tienen la capacidad de remover Hg de un medio líquido, tanto la cepa BA como la BN fueron inoculadas en Erlenmeyers que contenían 100 ml de caldo Lisogenia (medio en el cual las bacterias ya habían presentado una gran



adaptación y desarrollo), con concentraciones de 50; y 100 ppm de  $\text{HgCl}_2$ ; estos medios fueron incubados a temperatura ambiente usando un agitador (shaker) a 200 rpm durante 5 días. Luego de haber transcurrido el tiempo de incubación, se separó cuidadosamente el medio líquido, de una biopelícula que formaron las bacterias en las paredes del Erlenmeyer; el medio líquido fue almacenado en un frasco de vidrio junto a 1ml de ácido nítrico (con el fin de preservar la muestra) y enviado al laboratorio de análisis de agua ANAVANLAB, en Quito, con el fin determinar la concentración de Hg presente en el medio. Una reducción en la concentración de Hg en los medios líquidos indica que las bacterias fueron capaces de remover este metal de dicho medio. En este punto fue necesario tener una forma de control negativo, es decir, medios de cultivo sin bacterias, para verificar que no existan interferencias (distinta a la acción de las bacterias) que modifique la concentración inicial y final de Hg, tras haber transcurrido el tiempo de incubación; estos medios también fueron incubados a 200 rpm por 5 días (Coley & Zapata, 2006).

Debido a la pandemia de Covid-19 en este estudio sólo se realizaron dos réplicas del porcentaje de remoción por parte de las bacterias, y los resultados fueron analizados por separado ya que el tiempo entre réplica y réplica fue de seis meses; es así que, la primera réplica fue realizada en noviembre del 2020, mientras que la segunda réplica fue realizada en mayo del 2021, la diferencia entre estas dos fechas podría afectar los resultados ya que durante este tiempo las dos cepas de bacterias se encontraban en estado de conservación criogénica.

## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **5.1 Concentración de mercurio en las tres muestras de suelo de tres sitios de Portovelo**

El rango de concentración de Hg en el suelo de los sitios examinados de la zona minera de Portovelo estuvo entre 0,005 mg/kg y 195,6 mg/kg (Anexo 4,5,6; Figura 4). Estas concentraciones de Hg en el suelo son similares a las concentraciones reportadas por otros estudios realizados en esta misma zona (Duran, 2008; Oviedo et al., 2017) .

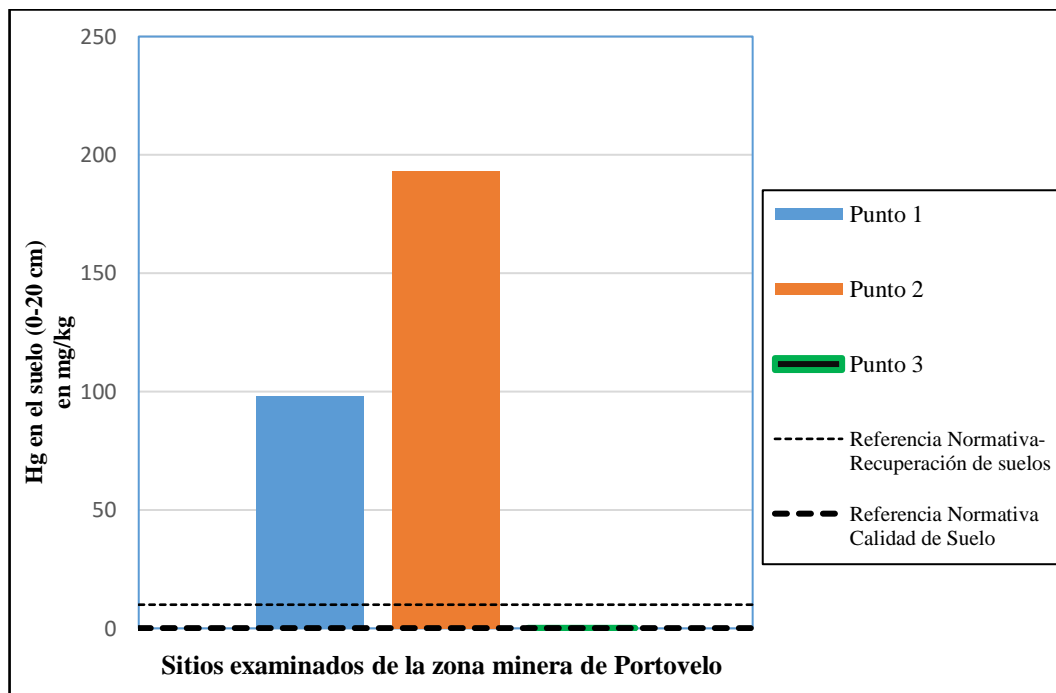
Dos de los tres sitios examinados por este estudio, tienen concentraciones de Hg en suelo (P1: 92,9 mg/kg y P2: 195,6 mg/kg; Figura 4) que están de fueran los límites establecidos en la normativa nacional tanto para un suelo de buena calidad (0,1 mg/kg; TULSMA,





2017) como también para un suelo en recuperación (10 mg/kg) (TULSMA, 2017). Así también, superan los límites establecidos en normativas internacionales, por ejemplo en Perú la concentración de Hg en suelo de uso comercial, extractivo o industrial, no debe superar los 24 mg/kg (MINAM, 2017); mientras que en México la concentración de Hg en suelos de uso agrícola, residencial y comercial, no debe superar los 23 mg/kg (PROFEPA, 2016). La elevada concentración de Hg en los dos puntos supone el uso de Hg en estos puntos para la separación de oro que viene dándose desde años pasados; por otro lado, en el punto donde no se detectó presencia de Hg se puede asumir que este metal pudo ser arrastrado por las lluvias o que en años anteriores no se utilizaba este metal en la separación de oro.

Las altas concentraciones de Hg en el suelo de los sitios evaluados, son un peligro y una amenaza grave para todos los habitantes y las especies de organismos que habitan cerca de las zonas mineras. En varios estudios se ha evidenciado que distintas concentraciones de Hg en el suelo pueden afectar a especies animales, por ejemplo, concentraciones de 5 mg/ kg en el suelo puede afectar a las vacas, produciéndoles gastroenteritis, disnea, dermatitis, anorexia, pérdida de equilibrio y fiebre; por otro lado, en cerdos concentraciones de 0,5 mg/kg de Hg en el suelo puede causarles anorexia, vómitos, ceguera, depresión, e incluso la muerte; en aves concentraciones de 2 mg/kg puedes causarles lesiones en los órganos y provocarles la muerte (Albuja et al., 2012; Elika, 2013).



**Figura 4.** Concentración de Hg en el suelo de los sitios examinados de la zona minera de Portovelo.

## 5.2 Grupos de bacterias de la zona minera de Portovelo resistentes a medios contaminados con Hg.

### 5.2.1 Aislamiento de microorganismos resistentes a Hg

El desarrollo de microorganismos surgió de las muestras de suelo M1 y M2, en los dos medios de cultivo (MacConkey y Sabourad Dextrose), los mismos que contenían 0; 50; y 100 ppm de  $\text{HgCl}_2$ ; por otro lado, de la muestra M3 no se evidenció crecimiento de ningún microorganismo. Los microorganismos que crecieron de la muestra M1, surgieron de la dilución  $10^{-3}$ ; mientras que los organismos que crecieron de la muestra M2 surgieron de las diluciones  $10^{-1}$ ;  $10^{-2}$ ;  $10^{-3}$  (Tabla 5).

En la muestra M2 las bacterias crecieron en las tres concentraciones, esto puede estar relacionado al hecho de tener una elevada concentración de Hg en el punto 2 (Figura 4). En este punto las bacterias pudieron estar sometidas a altos grados de estrés por la cantidad de Hg, razón por la cual pueden adaptarse a cualquier medio. Además podrían haber generado mecanismos de crecimiento en donde sólo las bacterias más aptas crecen, es por ello que a pesar que en  $10^{-1}$  la concentración de microorganismos es alta, sólo se adaptaron aquellos microorganismos que pudieron adaptarse al medio y lograron superar a otros.



El número de colonias de microorganismos fue mayor (visualmente) en los medios de cultivo que fueron inoculados con la dilución  $10^{-3}$  tanto para la muestra M1 como para M2, es por ello que las resiembras fueron realizadas sólo con los microorganismos que crecieron en los medios de cultivo con estas diluciones.

Tras haber realizado tres resiembras, se logró aislar 2 cepas de microorganismos puros, las cuales resultaron ser diferentes entre sí y lograron resistir concentraciones de 50 y 100 ppm de  $\text{HgCl}_2$ . A estas dos cepas de microorganismos se las denominó: BA y BN; la cepa BA se desarrolló a partir de la muestra M1 (Figura 5), mientras que la cepa BN se desarrolló a partir de la muestra M2 (Figura 6).

**Tabla 4. Establecimiento de microorganismos en medios de cultivo con diferentes concentraciones de  $\text{HgCl}_2$ .**

Muestras de suelo y sus diluciones en agua.	Medios de cultivo con 0; 50; y 100 ppm de $\text{HgCl}_2$					
	Agar MacConkey			Agar Sabouraud Dextrose		
	0 ppm	50 ppm	100 ppm	0 ppm	50 ppm	100 ppm
M1 ( $10^{-1}$ )	x	x	x	x	x	x
M1 ( $10^{-2}$ )	x	x	x	x	x	x
M1 ( $10^{-3}$ )	✓	✓	✓	✓	✓	✓
M2 ( $10^{-1}$ )	✓	✓	✓	✓	✓	✓
M2 ( $10^{-2}$ )	✓	✓	✓	✓	✓	✓
M2 ( $10^{-3}$ )	✓	✓	✓	✓	✓	✓
M3 ( $10^{-1}$ )	x	x	x	x	x	x
M3 ( $10^{-2}$ )	x	x	x	x	x	x
M3 ( $10^{-3}$ )	x	x	x	x	x	x

\* x No se evidencia desarrollo de microorganismos.

\*\*✓ Se evidencia desarrollo de microorganismos.



### 6.2.2 Grupos identificados de bacterias resistentes al Hg

Los resultados de las 6 pruebas de identificación aplicadas a las dos cepas de microorganismos resistentes al Hg seleccionadas (Tabla 5) nos permitieron distinguir e identificar de forma preliminar dos grupos de microorganismos de la siguiente manera:

Cepa BA: Bacilo Gram negativo, catalasa positiva, oxidasa positiva, King A y King B negativo, lactosa negativa, y morfología de bastón.

Cepa BN: Coco Gram negativo, catalasa negativa, oxidasa positiva, lactosa positiva, y morfología redonda.

Al analizar las características macroscópicas de las colonias que se desarrollaron a partir de las cepas BA y BN, se evidenció que las colonias de la cepa BA presentaron una superficie elevada, forma circular, borde redondo, textura rugosa, y un tamaño entre 1 y 2 mm; mientras que las colonias de la cepa BN presentaron una superficie elevada, forma circular, borde ondulado, textura lisa, y un tamaño entre 0,5 a 1 mm.

La tinción Gram fue negativa para las dos cepas y al analizar sus características microscópicas se pudo observar que la cepa BA presentaba estructuras en forma de bastón, además, eran cortas y agudizadas en los extremos (Figura 7); mientras que la cepa BN presentó estructuras esféricas. (Figura 8). De acuerdo a su forma estas bacterias fueron identificadas como un bacilo Gram Negativo (cepa BA) y un coco Gram Negativo (cepa BN) (Figura 9 y 10).

Tanto la cepa BA como la cepa BN resultaron ser oxidasa positivas, es decir, presentan la enzima citocromo c oxidasa, y por ende se pueden tratar de bacterias aerobias o anaerobias facultativas; además, se descarta que pudieran tratarse de *Enterobacteriaceae*.

La cepa BA resultó ser catalasa positiva, es decir presentan la enzima catalasa; por otro lado, la cepa BN resultó ser catalasa negativa, por lo tanto, no presenta la enzima catalasa, razón por la cual esta cepa de bacterias podría tratarse de *streptococos* o de algún otro género que presente la enzima citocromo oxidasa, pero no la enzima catalasa.

En agar MacConkey la cepa BA presentó un crecimiento, y sus colonias presentaron un color blanco-gris, razón por la cual se sospecha que podrían tratarse de bacterias lactosa



negativas; por otro lado, la cepa BN presentó colonias de color rosado, razón por la cual se sospechó que son bacterias fermentadoras de lactosa.

A la cepa BN no se le realizaron más pruebas de identificación, ya que no se llegó a tener ningún indicio del género de bacteria en cuestión.

A la cepa BA que se sospechaba que podría tratarse de bacterias *Pseudomonas*, por los resultados de las pruebas anteriores (catalasa positiva, oxidasa positiva, lactosa negativa), se le realizó las pruebas King A y King B, dando un resultado negativo en las dos pruebas, lo que significa que estas bacterias no producen los pigmentos pioverdina ni piocianina, razón por la cual se descarta que sean *Pseudomonas Aeruginosas*, si esta cepa se tratara de *Pseudomonas*. Se ha reportado que el género de bacterias *Pseudomonas*, se han desarrollado en diferentes ambientes contaminados con Hg (Pepi et al., 2011).

**Tabla 5. Resultados de las pruebas bioquímicas aplicadas para identificar los grupos de bacterias.**

Bacterias aisladas	Pruebas de identificación						
	Tinción Gram	Oxidasa	Catalasa	King A	King B	Agar Mc Conkey	Morfología (microscópica)
Cepa BA	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Lactosa Negativa	Bastón
Cepa BN	Negativo	Positivo	Negativo	-----	-----	Lactosa Positiva	Redondas, agrupadas en pares

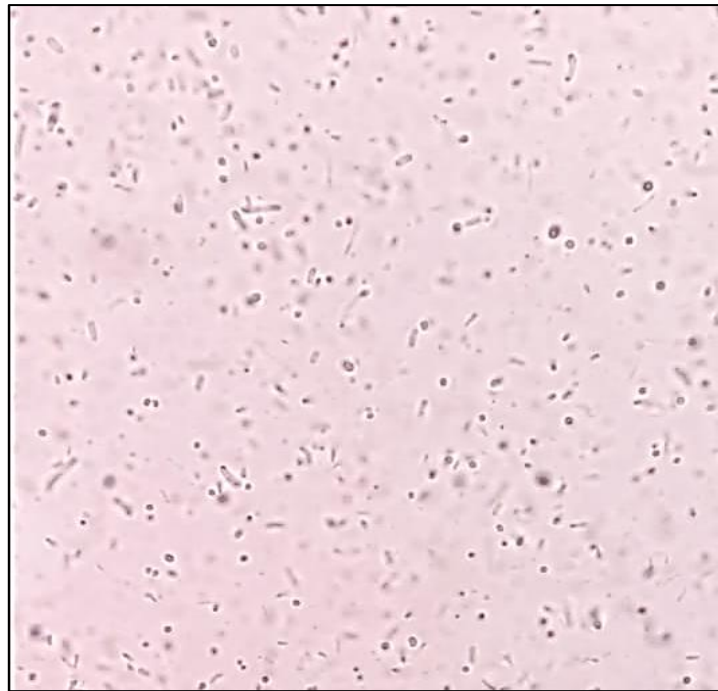
\*----- No se realizó



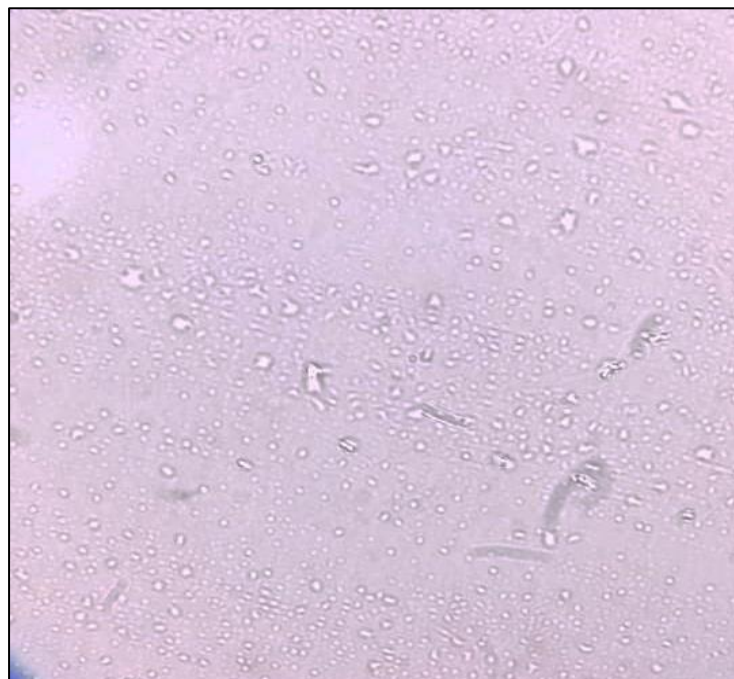
**Figura 5.** Cultivo de la cepa denominada “BA”, un bacilo Gram Negativo.



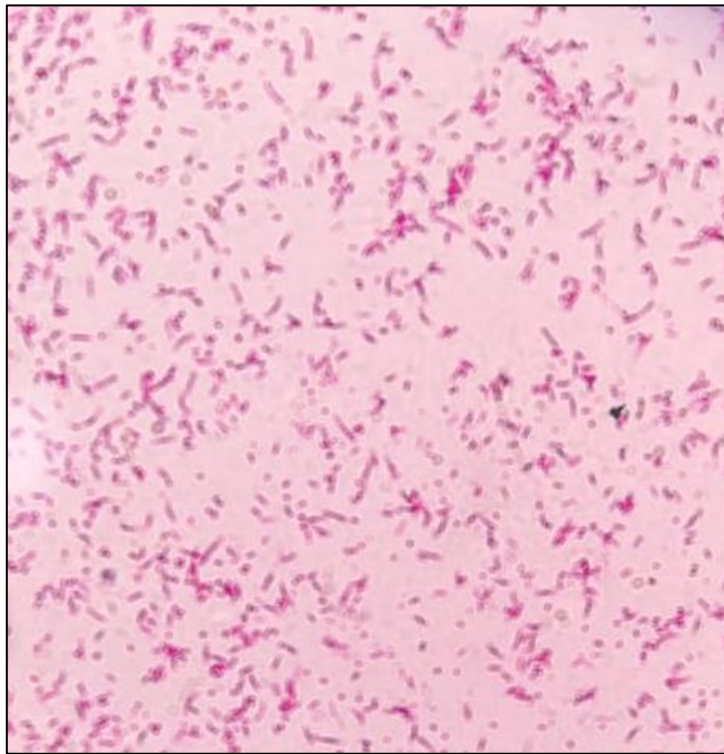
**Figura 6.** Cultivo de la cepa denominada “BN”, un Cocco Gram Negativo.



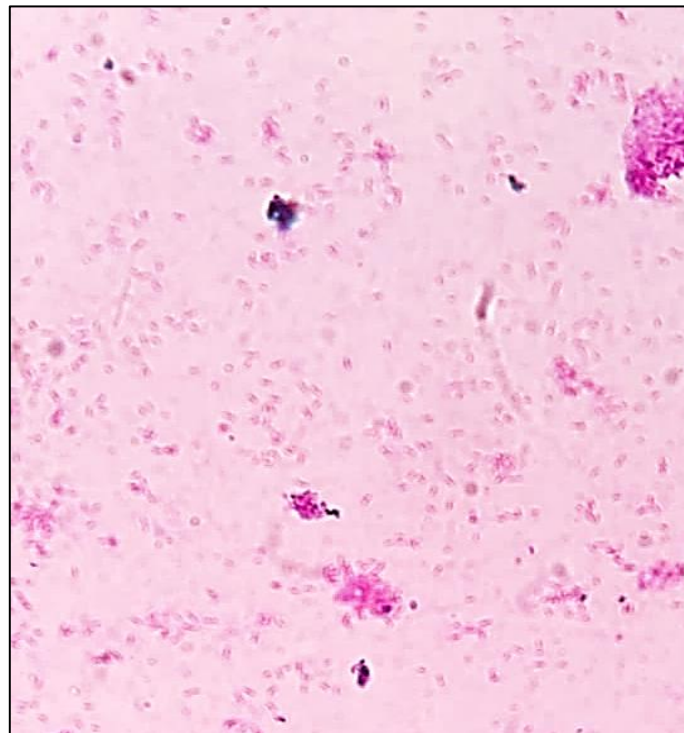
**Figura 7.** Ceba BA vista en el microscopio.



**Figura 8.** Ceba BN vista en el microscopio.



**Figura 9.** Tinción Gram de la cepa BA.



**Figura 10.** Tinción Gram de la cepa BN.





### 6.3 Cinética de crecimiento Bacteriano

El análisis de crecimiento bacteriano se realizó en las dos réplicas por separado, ya que el rango de valores fue muy grande, generando un elevado error estándar, que a su vez genera un porcentaje de incertidumbre considerable; además, debido a que el tiempo entre una réplica y otra réplica fue de seis meses, pudo causar que las condiciones de crecimiento entre las dos réplicas fueran diferentes. Las dos cepas de bacterias presentaron crecimiento en las tres concentraciones (0;50; y 100 ppm) de HgCl<sub>2</sub>.

Las dos cepas de bacterias presentaron crecimiento en las tres concentraciones (0;50; y 100 ppm) de HgCl<sub>2</sub>. En la primera réplica (R1) el número de colonias tanto de la cepa BA como de la cepa BN resultó ser mayor que la réplica 2 (R2) en todas las concentraciones de HgCl<sub>2</sub> (Tabla 6).

Se observaron tendencias de crecimiento completamente diferentes en cada concentración. En la cepa de bacilos a medida que aumenta la concentración de HgCl<sub>2</sub> disminuye el número de colonias (Tabla 6); mientras que, en la cepa de cocos, el número de colonias fue mayor en una concentración de 50 ppm, que en 0 o 100 ppm de HgCl<sub>2</sub> (Figuras 11 y 12).

Tanto en R1 como en la R2, la tasa de crecimiento de las bacterias en las tres concentraciones de HgCl<sub>2</sub>, se desarrolló de forma común, siguiendo las cuatro fases típicas de la curva de crecimiento bacteriano, las cuales son: fase de latencia, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte (Figuras 11 y 12).

En las dos réplicas, en una concentración de 0 ppm la cepa de bacilos presentó una fase de latencia muy corta; la fase exponencial o de crecimiento rápido, se produjo aproximadamente a partir del día uno y duró hasta el día siete, a partir de este día el número de colonias no varió hasta el día diez; mientras tanto la cepa de cocos presentó una fase de latencia que duró hasta el día dos, a partir de este día se dio una fase exponencial hasta el día siete, y a partir de ese punto se produjo la fase estacionaria hasta el día diez (Figuras 11 y 12).

En las dos réplicas, en una concentración de 50 ppm de HgCl<sub>2</sub> tanto la cepa de bacilos como la de cocos presentaron una fase de latencia que duró menos de un día; la fase exponencial se produjo aproximadamente a partir del día uno, y llegó a su pico máximo



de crecimiento en el día siete, a partir de este día se produjo una fase estacionaria en donde el número de colonias se mantuvo constante y no aumentó (Figuras 11 y 12).

En las dos réplicas, en una concentración de 100 ppm de  $\text{HgCl}_2$  la cepa de bacilos presentó una fase de latencia corta que duró menos de un día, puesto que se puede observar que desde aproximadamente el día uno se presenta un crecimiento exponencial, este crecimiento, a diferencia de las otras concentraciones se mantiene hasta el día diez y recién en ese punto comienza la fase estacionaria. Por otro lado, la cepa de cocos de igual manera presenta una fase de latencia muy corta, presentando un crecimiento exponencial desde el día uno aproximadamente, que duró hasta el día siete, en donde comenzó la fase estacionaria (Figuras 11 y 12).

Debido a que no es posible diferenciar las bacterias muertas de las bacterias vivas en placa, no se pudo evidenciar la fase de muerte y por ende el conteo finalizó en el día diez cuando el número de colonias no varió en tres días, a excepción de la cepa de bacilos, que en una concentración de 100 ppm la fase estacionaria recién comenzó en el día diez.

La distribución de los datos no se dio de forma normal, es decir las curvas de crecimiento no fueron en forma de campana de Gauss; en este caso las curvas presentaron una distribución sesgada a la izquierda, es decir, los datos se encuentran a la izquierda de la distribución, debido a que las bacterias crecieron muy rápido en los primeros días, teniendo una fase de latencia corta, y una fase exponencial que comenzó desde el día uno aproximadamente (Figura 11).

En R1 en ausencia de  $\text{HgCl}_2$  la cepa de bacilos presentó un mayor desarrollo de colonias ( $9,39\text{E}+09$ ) que la cepa de cocos ( $4,90\text{E}+08$ ); en R2 se dio algo similar, ya que la cepa de bacilos presentó un mayor desarrollo de colonias ( $8,90\text{E}+09$ ) que la cepa de cocos ( $4,13\text{E}+08$ ) (Tabla 6).

En R1, en una concentración de 50 ppm de  $\text{HgCl}_2$  la cepa de cocos presentó un mayor desarrollo de colonias ( $4,45\text{E}+09$  UFC) que la cepa de bacilos ( $6,75\text{E}+08$  UFC); mientras que en R2 se dio algo similar, ya que el desarrollo de colonias de la cepa de cocos resultó ser mayor ( $3,45\text{E}+09$ ) que la cepa de bacilos ( $4,89\text{E}+08$ ) (Tabla 6).

En R1 en una concentración de 100 ppm de  $\text{HgCl}_2$  la cepa de bacilos presentó un mayor desarrollo de colonias ( $5,36\text{E}+08$ ) que la cepa de cocos ( $9,44\text{E}+07$ ); mientras en la R2 la



cepa de bacilos también fue mayor ( $4,08E+08$ ) que la cepa de cocos ( $8,97E+07$ ) (Tabla 6).

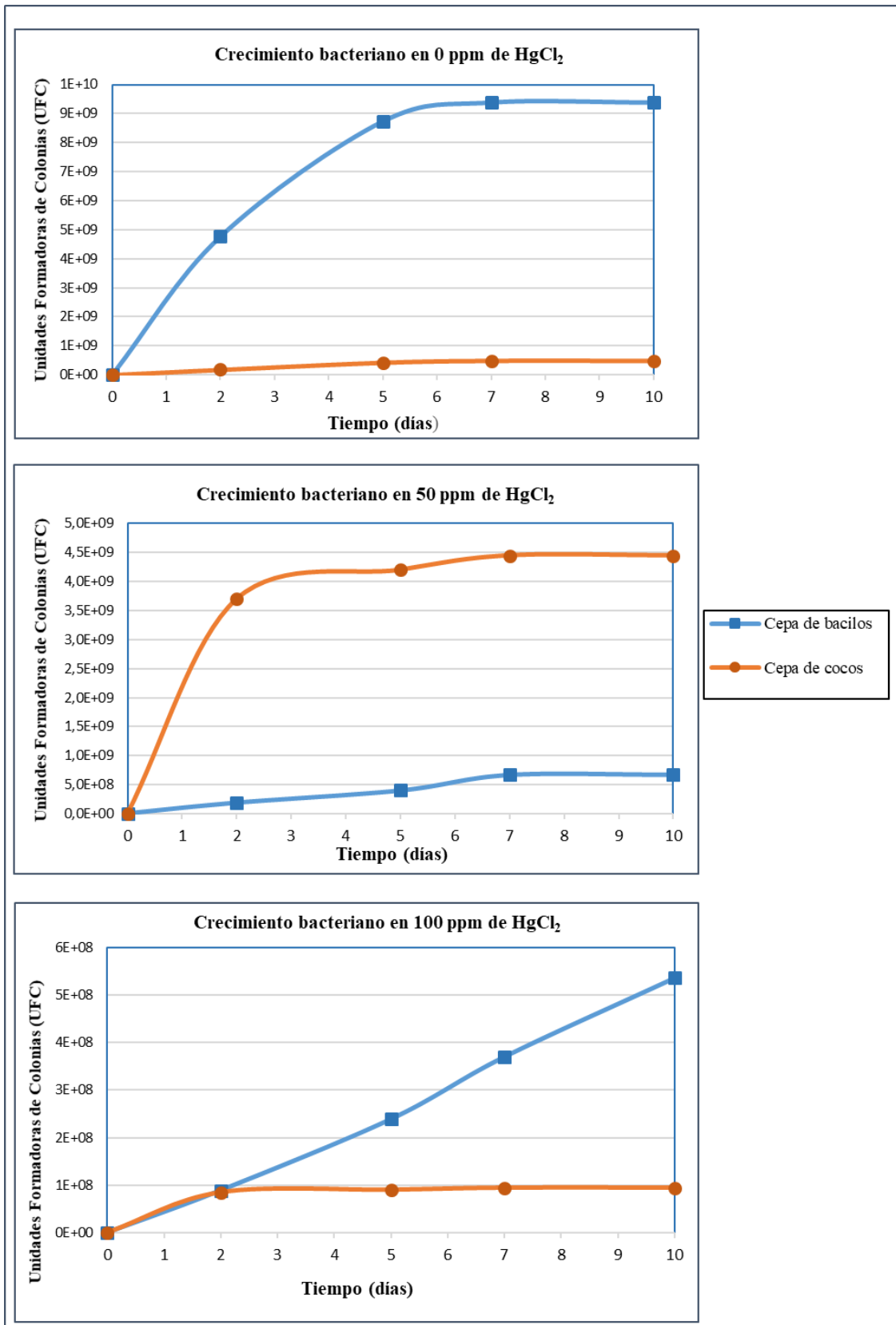
A pesar que las réplicas fueron realizadas en fechas diferentes, la tendencia que presentó R2 se mantiene en todas las concentraciones tal y como sucede en R1, sin embargo, en la R2 se identificó que el número de colonias tuvo un descenso considerable, lo que sugiere que las bacterias perdieron su efectividad en este tiempo. El hecho de no volver a realizar resiembras e ir adaptando nuevamente a las dos cepas de bacterias, pudo afectar el resultado final en R2.

En las dos réplicas, la cepa de cocos presentó un mayor crecimiento en 50 ppm de  $HgCl_2$ , mientras que la cepa de bacilos presentó mayor crecimiento en 100 ppm, por ello, se puede sugerir que la cepa de bacilos tuvo una mayor capacidad de resistencia a concentraciones elevadas de Hg en relación con la cepa de cocos.

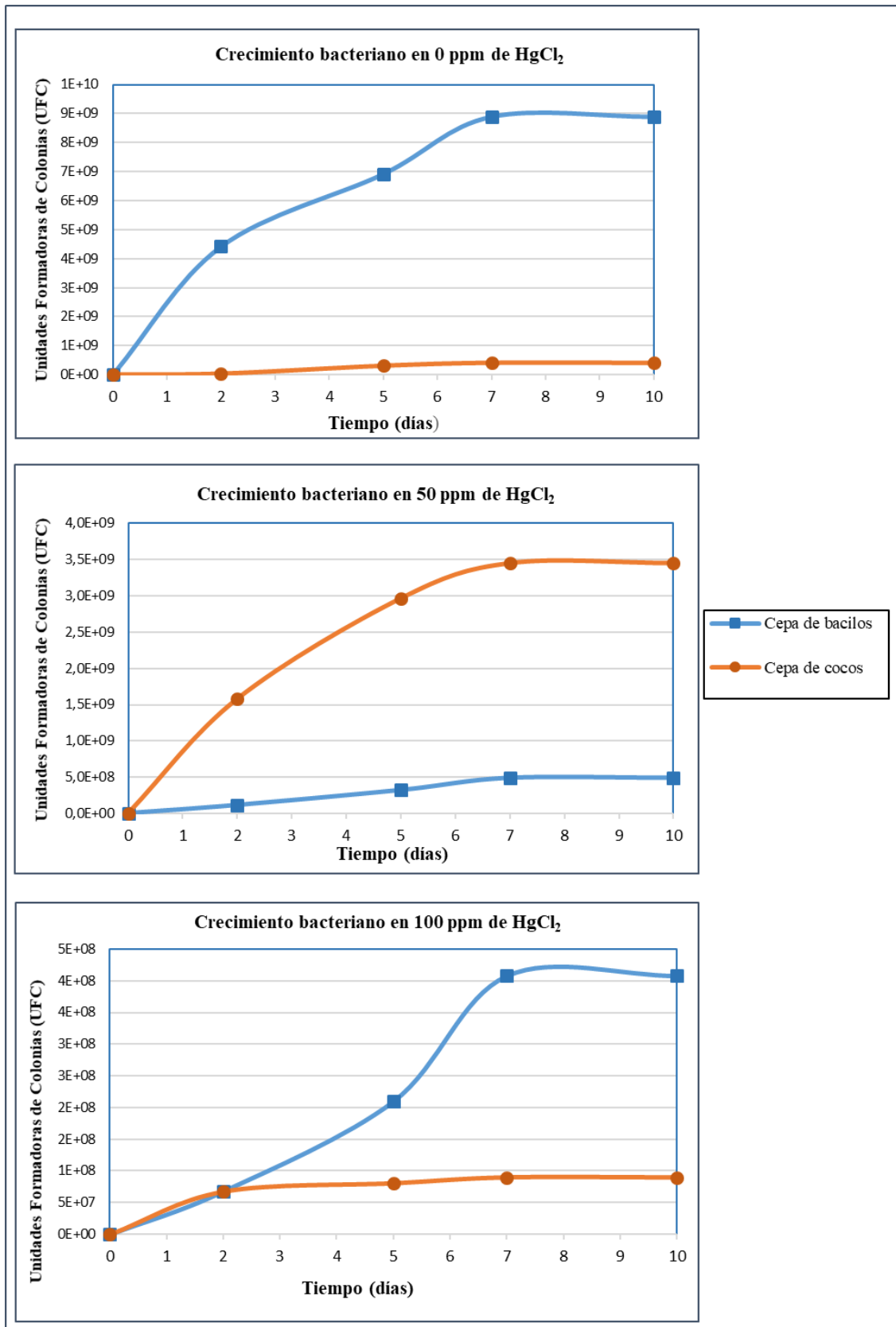
Las bacterias son microorganismos muy complejos, en este trabajo se puede observar como la cepa de cocos presenta un mayor crecimiento en 50 ppm que en 0m y 100 ppm, en las dos réplicas. Se cree que estas bacterias se desarrollaron de suelos que presentaron concentraciones cercanas a 50 ppm, por esta razón al someterlas a estas concentraciones, éstas pudieron desarrollarse mejor que en medios sin mercurio o con concentraciones superiores.

**Tabla 6. UFC de las cepas de bacilos y cocos desarrolladas en 0; 50; y 100 ppm de  $HgCl_2$**

Tiempo (días)	UFC de bacilos (BA) y cocos (BN)											
	BA (0 ppm)		BN (0 ppm)		BA (50 ppm)		BN (50 ppm)		BA (100 ppm)		BN (100 ppm)	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2	R1	R2
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	4,77E+09	4,42E+09	1,79E+08	3,44E+08	1,87E+08	1,14E+08	3,70E+09	1,58E+09	8,90E+07	6,80E+07	8,48E+07	6,73E+07
5	8,74E+09	6,92E+09	4,24E+08	3,11E+08	4,01E+08	3,21E+08	4,20E+09	2,97E+09	2,39E+08	2,10E+08	9,00E+07	8,05E+07
7	9,39E+09	8,90E+09	4,90E+08	4,13E+08	6,73E+08	4,89E+08	4,45E+09	3,45E+09	3,70E+08	4,08E+08	9,42E+07	8,97E+07
10	9,39E+09	8,90E+09	4,90E+08	4,13E+08	6,75E+08	4,89E+08	4,45E+09	3,45E+09	5,36E+08	4,08E+08	9,44E+07	8,97E+07



**Figura 11.** Cinética de crecimiento bacteriano de las dos cepas de bacterias en diferentes concentraciones de HgCl<sub>2</sub> en R1.



**Figura 12.** Cinética de crecimiento bacteriano de las dos cepas de bacterias en diferentes concentraciones de HgCl<sub>2</sub> en R2.



#### 6.4 Remoción de Hg por parte de las bacterias aisladas.

A excepción del medio de cultivo que no contenía bacterias, en todos los medios de cultivo se realizó dos réplicas y se analizó por separado el porcentaje de remoción de las dos cepas de bacterias en las distintas concentraciones de Hg (Anexo 6,7,8,9,10,11,12,13; Tabla 7).

Las concentraciones finales de Hg en la réplica 1 (R1) que contenían bacterias son muy bajas llegando a tener valores de 0,003 a 0,004 ppm, mientras que en la réplica 2 (R2) los las concentraciones finales fueron mayores, siendo el valor más alto de 2,85 ppm. Es importante mencionar que R 2 se realizó seis meses después de R1, durante este tiempo las bacterias se encontraban en refrigeración, razón por la cual se podría pensar que las bacterias pudieron haber disminuido su eficiencia para remover Hg, lo que concuerda con la cantidad de UFC presentado en el resultado anterior.

Al trabajar con el promedio entre las dos réplicas, se obtuvo un error estándar elevado, lo que significa un rango de valores muy dispersos, razón por la cual cada réplica se analizó por separado.

En los dos medios de cultivo que no contenían bacterias la concentración final de Hg fue de 70 y 35 ppm en las dos réplicas, presentando una variación con respecto a las concentraciones iniciales (Tabla 7). Se pensaría que los valores no deberían disminuir debido a que no se agregaron bacterias, sin embargo, esta variación ocurre debido a que en laboratorio sólo se analiza el mercurio como tal, dejando de lado el ion cloruro; por esta razón, y a pesar que se trabajó con concentraciones de 100 y 50 ppm de  $\text{HgCl}_2$ , ocurrió una disminución de las concentraciones iniciales.

El porcentaje de remoción de Hg en todos los medios de cultivo en donde actuaron las cepas de bacilos y cocos fue superior al 99%, en R1, mientras que en R2 los valores son mayores al 98%. Además, en los medios de cultivo que no contenían bacterias el porcentaje de remoción fue del 30%, porcentaje que se sospecha es del ion cloruro dentro del compuesto de  $\text{HgCl}_2$  (Figura 13).

En estudios similares en donde se han aislado bacterias de zonas mineras para remover Hg, los porcentajes de remoción también son elevados, así como la cantidad de Hg acumulado por gramo de peso seco de bacterias. Por ejemplo:



Ekyastuti & Setyawati (2015), informaron que 4 cepas de bacterias aisladas desde relaves mineros, pudieron resistir concentraciones de hasta 100 ppm de Hg en medio selectivo sólido. Estas bacterias también presentaron acumulación de Hg cuando fueron inoculadas en medio líquido con concentración de 100 ppm de Hg. Las bacterias *Bacillus subtilis* 1, *Bacillus subtilis* 2, *Burkholderia cepacia*, y *Burkholderia cenosepacia* acumularon 58,9%, 33,4%, 10,9% y 66,2% de Hg, respectivamente.

Irawati et al. (2012) informaron que la bacteria *Brevundimonas sp* aislada desde relaves mineros, puede acumular  $Hg^{2+}$  hasta 1.09 y 2,7 mg/g de peso seco de las células y eliminar 64,38 y 57,10% de  $Hg^{2+}$  de medios que contienen 50 y 100 ppm de  $HgCl_2$ , respectivamente.

Chasanah et al. (2018), por otro lado, aisló 4 cepas de bacterias desde relaves mineros para determinar su capacidad de acumular Hg en caldo nutritivo que contenía 10, 20 y 30 ppm de Hg durante 24 horas, y en relaves de minas de oro a pequeña escala que contenían 41,37 ppm de Hg durante 2 semanas. la acumulación de mercurio de las cuatro bacterias aplicadas en los relaves de las minas de oro a pequeña escala, fue de 76,1% para *Fusobacterium aquatile*, de 75,6% para *Brevundimonas vesicularis*, de 74,4% para *Fusobacterium necrogenes*, y de 74,2% para *Nitrococcus mobilis*.

Por último, Deng & Wang (2012) aislaron 3 cepas bacterianas de sedimentos marinos que mostraron fuerte resistencia al  $Hg^{2+}$ , (hasta 120 ppm). Estas bacterias: *Pseudomonas sp*, *Staphylococcus pasteurii*, y *Brevibacterium casei*, fueron capaces de acumular 133,33; 92,59 y 121,95 mg/g de  $Hg^{2+}$  respectivamente.

En todos estos estudios, se midió el porcentaje de remoción de Hg directamente en el medio líquido; y luego de remover las bacterias acumuladas en forma de sobrenadante, se determinó acumulación de Hg por parte de los microorganismos. En la presente investigación sólo se midió la remoción del Hg en el medio líquido.

Además, es importante destacar que en la mayoría de estos estudios el tiempo de incubación duró 1 día, mientras que el tiempo de incubación en este trabajo fue de 5 días, esto podría suponer una de las razones por la cual se removió un mayor porcentaje de Hg en este trabajo.



En los estudios anteriormente mencionados, la disminución de la concentración de Hg en los medios de cultivo líquidos que fueron inoculados con las diferentes bacterias, fue dada por dos mecanismos: 1) Por la presencia de enzimas como la mercurio reductasa en las bacterias, que pueden transportar el Hg al interior de la célula, y en lugar de volatilizarlo al exterior, pueden bioacumular este metal en el interior de la célula; y b) Por biosorción, mecanismo asociado a la presencia de exopolisacáridos en la pared celular bacteriana que sirve como quelante de metales pesados en la superficie celular, que puede dar lugar a una acumulación de Hg en las células.

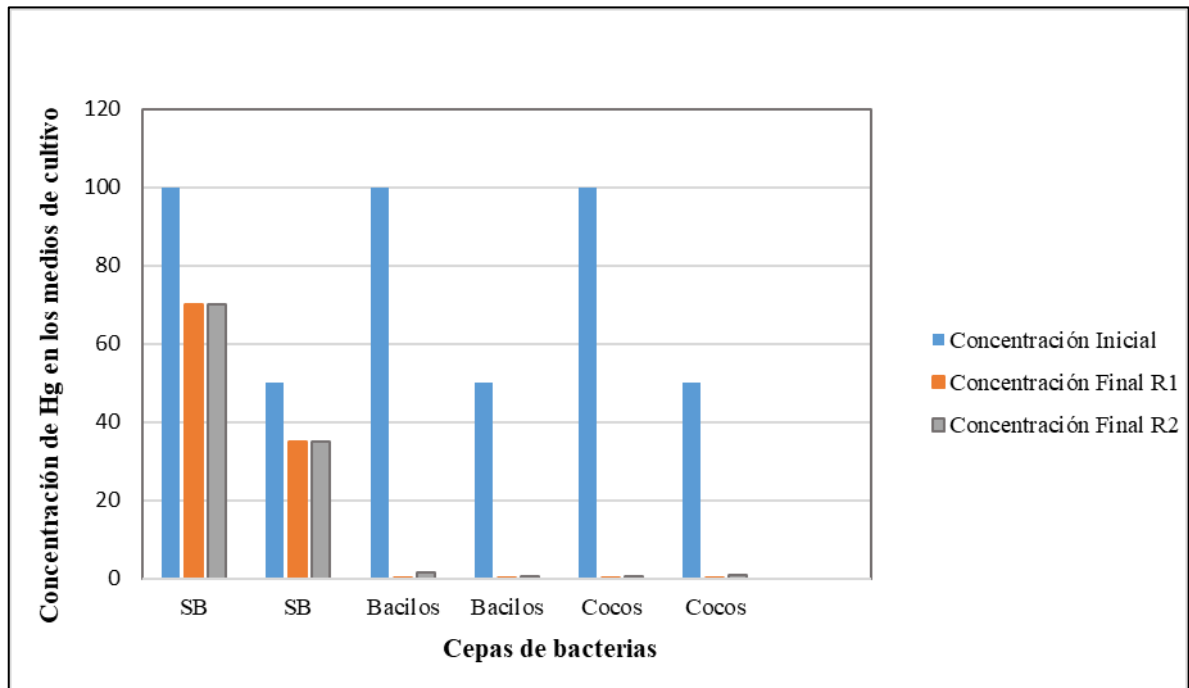
En este estudio en particular, por lo observado (Figura 13) se sospecha que la remoción de Hg de los medios líquidos, puede estar asociado al proceso de biosorción, ya que se pudo observar claramente la formación de biopelículas bacterianas en las paredes de los Erlenmeyers en donde se inocularon las dos cepas de bacterias (Figura 12), las mismas que pudieron ser formadas por agentes quelantes de las bacterias, sin embargo, no se descarta la acumulación de Hg por acción enzimática, o una combinación de los dos mecanismos. El Hg mercurio desapareció del líquido, pero más que seguro no se hizo aire, sino que se acumuló en forma sólida en las costras; este sería el trabajo logrado por ellos: Limpiar el líquido y acumular una fase sólida.

**Tabla 7. Porcentaje de remoción de Hg en medio líquido.**

Bacteria	Concentración inicial de $HgCl_2$	Concentración final $Hg$ R1 (ppm)	Concentración final $Hg$ R2 (ppm)	Porcentaje de Remoción R1 (%)	Porcentaje de Remoción R2 (%)
*SB	100	70	70	30,00	30,00
*SB	50	35	35	30,00	30,00
Bacilos	100	0,003	2,85	99,99	97,150
Bacilos	50	0,003	0,95	99,99	98,100
Cocos	100	0,004	0,68	99,99	99,320
Cocos	50	0,003	1,96	99,99	96,080

\*SB: Medio de cultivo sin bacterias.





**Figura 13.** Concentración de Hg en los medios líquidos luego de 5 días de inoculación.  
\*SB: Medio de cultivo sin bacterias.



**Figura 14.** Biopelículas bacterianas en los Erlenmeyers luego de 5 días de incubación.



## 6. CONCLUSIONES

Los suelos de 2 de los 3 sitios examinados de la zona minera de Portovelo presentan elevadas concentraciones de Hg, es decir están contaminados por este metal. Además se evidenció que suelos que se encuentran en los alrededores de áreas mineras no presentaron Hg, por otro lado aquellos suelos en donde ocurre prácticas mineras, especialmente amalgamación las concentraciones de Hg son elevadas.

Se encontraron y seleccionaron 2 grupos de bacterias resistentes a concentraciones de 50 y 100 ppm de  $\text{HgCl}_2$ . El primer grupo se trata de bacterias Gram Negativas del morfotipo Bacilo, mientras que el segundo grupo se trata de bacterias Gram Negativas con morfotipo Coco.

El grupo de bacterias Bacilo Gram negativo a diferencia del grupo de bacterias Coco Gram Negativo presentó un mayor crecimiento de colonias tanto en los medios no contaminados con  $\text{HgCl}_2$ , como en los medios con una concentración de 100 ppm de  $\text{HgCl}_2$ . Sin embargo, el grupo de bacterias Coco Gram Negativo mostró mayor crecimiento de colonias en medios contaminados con 50 ppm de  $\text{HgCl}_2$ .

En la réplica 1 los dos grupos de bacterias BA y BN mostraron que tienen la capacidad de remover un porcentaje mayor al 99% de Hg presente en medio líquido; mientras que en la réplica 2 el porcentaje de remoción fue superior al 96% por parte de las dos cepas de bacterias.

## 7. RECOMENDACIONES

1. Es importante realizar la toma de muestras al menos por triplicado en cada punto, de esta forma se tendrá un valor de referencia con datos estadísticos que corroborarán la concentración de Hg en cada punto.
2. Se sugiere que, en el próximo plan de ordenamiento territorial del Cantón Portovelo, se tome en cuenta aquellas zonas en donde ocurren prácticas mineras para cambiar el uso de suelo, ya que muchas de estas zonas se encuentran con un uso de suelo agrícola.
3. Para disminuir errores durante la medición de la concentración de Hg que pueden surgir por el transporte y manejo de las muestras, se sugiere que todo el proceso se realice en el mismo laboratorio, sin acudir a laboratorios particulares.



4. Es de suma importancia la medición de la concentración de Hg en las biopelículas formadas en los Erlenmeyer, ya que ahí se puede saber la cantidad exacta de Hg que las bacterias pudieron adsorber por cada gramo de biopelícula.
5. Para que el estudio tenga validez para próximas investigaciones, es necesario realizar una identificación bacteriana más a fondo, realizando más pruebas bioquímicas o utilizando técnicas más avanzadas como el análisis del ADN de cada cepa de bacteria.
6. Es necesario generar un mayor número de réplicas y en el mismo período de tiempo y bajo las mismas condiciones para poder trabajar con el promedio y determinar el error.
7. Es importante que este estudio pueda ser compartido ya que podría ser de sumo interés para entidades que se dedican a investigar la biorremediación, o para gobiernos municipales que quieran remediar sus suelos de Hg ya que es un metal sumamente peligroso y que afecta a la salud humana.
8. La toma de muestras se considera como uno de los puntos más importantes y a la vez más difíciles debido al hecho de que no se puede tener acceso a las zonas mineras, por esta razón, hay que estar preparados y buscar estrategias de convencimiento a los propietarios de los terrenos.



## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdu, N., Abdullahi, A. A., & Abdulkadir, A. (2017). Heavy metals and soil microbes. *Environmental Chemistry Letters*, 15(1), 65-84. <https://doi.org/10.1007/s10311-016-0587-x>
- Adelaja, O. (2012). Tolerance of TBT-resistant Bacteria Isolates to Methylmercury. *Research Journal of Environmental Sciences*, 6, 1-13. <https://doi.org/10.3923/rjes.2012.1.13>
- Ahluwalia, S. S., & Goyal, D. (2007). Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresource Technology*, 98(12), 2243-2257. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.12.006>
- Albuja, L., Montalvo, D., Cáceres, F., & Jácome, N. (2012). Niveles de mercurio en aves silvestres de tres regiones mineras del sur del Ecuador. *Revista Politécnica*, 30(3), 18-32.
- Alloway, B. J. (Ed.). (2013). *Metales pesados en suelos, Texto original: Trazas de metales y metaloides en suelos y su biodisponibilidad*. Springer Países Bajos. <https://www.springer.com/gp/book/9789400744691>
- Anriquez, A., Albanesi, A., Kunst, C., Ledesma, R., López, C., Rodríguez Torresi, A., & Godoy, J. (2005). Rolado de fachinales y calidad de suelos en el Chaco occidental, Argentina. *Ciencia del suelo*, 23(2), 145-157.
- Arroyave, C., Araque, P., & Pelaez, C. (2019). Evaluación de la bioacumulación y toxicidad de cadmio y mercurio en pasto llanero (*Brachiaria dictyoneura*). *Vite*, 17(1), 45-49.
- Baldi, F., Gallo, M., Marchetto, D., Fani, R., Maida, I., Horvat, M., Fajon, V., Zizek, S., & Hines, M. (2012). Seasonal mercury transformation and surficial sediment



- detoxification by bacteria of Marano and Grado lagoons. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 113, 105-115. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2012.02.008>
- Ball, M. M., Carrero, P., Castro, D., & Yarzabal, L. A. (2007). Mercury resistance in bacterial strains isolated from tailing ponds in a gold mining area near El Callao (Bolívar State, Venezuela). *Current Microbiology*, 54(2), 149-154. Scopus. <https://doi.org/10.1007/s00284-006-0347-4>
- Barkay, T., Miller, S. M., & Summers, A. O. (2003). Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2-3), 355-384. [https://doi.org/10.1016/S0168-6445\(03\)00046-9](https://doi.org/10.1016/S0168-6445(03)00046-9)
- Barkay, T., & Wagner, I. (2005). Microbial Transformations of Mercury: Potentials, Challenges, and Achievements in Controlling Mercury Toxicity in the Environment. En *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 57, pp. 1-52). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(05\)57001-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(05)57001-1)
- Bayramoğlu, G., & Arica, M. Y. (2008). Removal of heavy mercury(II), cadmium(II) and zinc(II) metal ions by live and heat inactivated *Lentinus edodes* pellets. *Chemical Engineering Journal*, 143(1), 133-140. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2008.01.002>
- Beltrán, M., & Gómez, A. (2016). Biorremediación de Metales Pesados Cadmio (Cd), Cromo (Cr) y Mercurio (Hg), Mecanismos Bioquímicos e Ingeniería Genética: Una Revisión. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 12(2), 172-197. <https://doi.org/10.18359/rfcb.2027>
- Ber, R., Mamroud, E., Aftalion, M., Tidhar, A., Gur, D., Flashner, Y., & Cohen, S. (2003). Development of an Improved Selective Agar Medium for Isolation of *Yersinia pestis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(10), 5787-5792. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.10.5787-5792.2003>



- Betancourt, O., Narváez, A., & Roulet, M. (2005a). Small-scale Gold Mining in the Puyango River Basin, Southern Ecuador: A Study of Environmental Impacts and Human Exposures. *EcoHealth*, 2(4), 323-332.  
<https://doi.org/10.1007/s10393-005-8462-4>
- Betancourt, O., Narváez, A., & Roulet, M. (2005b). Small-scale Gold Mining in the Puyango River Basin, Southern Ecuador: A Study of Environmental Impacts and Human Exposures. *EcoHealth*, 2(4), 323-332.  
<https://doi.org/10.1007/s10393-005-8462-4>
- Blesa, M., & Castro, G. (2015). *Historia Natural y Cultural del Mercurio* (1.<sup>a</sup> ed.). AAPC.
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601-608.  
<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Bourg, A. C. M. (1995). Speciation of Heavy Metals in Soils and Groundwater and Implications for Their Natural and Provoked Mobility. En U. Förstner, W. Salomons, & P. Mader (Eds.), *Heavy Metals: Problems and Solutions* (pp. 19-31). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-79316-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-79316-5_2)
- Cabral, L., Giovanella, P., Gianello, C., Bento, F. M., Andrezza, R., & Camargo, F. A. O. (2013). Isolation and characterization of bacteria from mercury contaminated sites in Rio Grande do Sul, Brazil, and assessment of methylmercury removal capability of a *Pseudomonas putida* V1 strain. *Biodegradation*, 24(3), 319-331.  
<https://doi.org/10.1007/s10532-012-9588-z>
- Caiza, G. (2018). *Mercurio en el suelo. Contaminación y remediación*. Universidad Complutense de Madrid.



- Callicó, A., Cedré, B., Sifontes, S., Torres, V., Pino, Y., Callis, A., & Esnad, S. (2004). Caracterización fenotípica y serológica de aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. *Instituto Finlay*, 3.
- Camargo, J. C., Muñoz, D. A., & Arias, J. P. (2014). Evaluación del contenido de mercurio en suelos y lechos de quebradas en la zona minera de Miraflores, Quinchía, Colombia. *Acta Agronómica*, 64(2), 165-177.  
<https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.40639>
- Castillo, C. (2005). *Resistencia a la contaminación por mercurio: Microorganismos y mecanismos moleculares asociados* [Investigativo]. Universidad de los Andes.
- Chasanah, U., Nuraini, Y., & Handayanto, E. (2018). The Potential of Mercury-Resistant Bacteria Isolated from Small-Scale Gold Mine Tailings for Accumulation of Mercury. *Journal of Ecological Engineering*, 19(2), 236-245.  
<https://doi.org/10.12911/22998993/83565>
- Chesworth, W. (Ed.). (2008). Soil quality. En *Encyclopedia of Soil Science* (pp. 699-699). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3995-9\\_550](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3995-9_550)
- Coley, T., & Zapata, D. (2006). *Aislamiento y purificación de microorganismos degradadores de cianuro* [Investigación]. Universidad de EAFIT.
- Covarrubias, S. A., García Berumen, J. A., & Peña Cabriales, J. J. (2015). Microorganisms role in the bioremediation of contaminated soils with heavy metals. *Acta Universitaria*, 25(NE-3), 40-45.  
<https://doi.org/10.15174/au.2015.907>
- Covarrubias, S., García, J., & Peña, J. (2015). El papel de los microorganismos en la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados. *Acta Universitaria*, 25(3), 40-45.



- Covarrubias, S., & Peña, J. (2017). CONTAMINACIÓN AMBIENTAL POR METALES PESADOS EN MÉXICO: PROBLEMÁTICA Y ESTRATEGIAS DE FITORREMEDIACIÓN. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33(esp01), 7-21. <https://doi.org/10.20937/RICA.2017.33.esp01.01>
- Crane, S., Dighton, J., & Barkay, T. (2010). Growth responses to and accumulation of mercury by ectomycorrhizal fungi. *Fungal Biology*, 114(10), 873-880. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2010.08.004>
- Cuvi, N., & Bejarano, M. (2015). Los halos de inhibición en la remediación de suelos amazónicos contaminados con petróleo. *História, Ciências, Saúde-Manguinhos*, 22(suppl), 1693-1714. <https://doi.org/10.1590/S0104-59702015000500009>
- Dang, F., Li, Z., & Zhong, H. (2019). Methylmercury and selenium interactions: Mechanisms and implications for soil remediation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 49(19), 1737-1768. Scopus. <https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1583051>
- Das, S. (2014). *Microbial biodegradation and bioremediation*. Elsevier.
- Dash, H. R., & Das, S. (2012). Bioremediation of mercury and the importance of bacterial mer genes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 75, 207-213. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.07.023>
- Dash, H. R., Mangwani, N., & Das, S. (2014). Characterization and potential application in mercury bioremediation of highly mercury-resistant marine bacterium *Bacillus thuringiensis* PW-05. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(4), 2642-2653. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2206-8>
- De, J., Dash, H. R., & Das, S. (2014). Mercury Pollution and Bioremediation—A Case Study on Biosorption by a Mercury-Resistant Marine Bacterium. En *Microbial*





- Biodegradation and Bioremediation* (pp. 137-166). Elsevier.  
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800021-2.00006-6>
- Diaz, F. A. (2015). Mercurio en la minería del oro: Impacto en las fuentes hídricas destinadas para consumo humano. *Revista de Salud Pública*, 16(6), 947-957.  
<https://doi.org/10.15446/rsap.v16n6.45406>
- Diep, P., Mahadevan, R., & Yakunin, A. F. (2018). Heavy Metal Removal by Bioaccumulation Using Genetically Engineered Microorganisms. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00157>
- Doadrio, A. (2004). Ecotoxicología y acción toxicológica del mercurio. *Anales de la Real Academia de Farmacia*, 70(4).
- Duran, J. (2008). *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*. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.
- Durán, L. F., & Hernández, M. J. L. (2017). BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR ORGANOCLORADOS MEDIANTE LA ESTIMULACIÓN DE MICROORGANISMOS AUTÓCTONOS, UTILIZANDO BIOSÓLIDOS. *Nexo Revista Científica*, 29(01), 22.  
<https://doi.org/10.5377/nexo.v29i01.4397>
- Durango, J. V. V., Marrugo, J., Jaramillo, B., & Castro, L. M. P. (2010). Remediación de suelos contaminados con mercurio utilizando guarumo (*Cecropia peltata*). *Ingeniería y Desarrollo*, 27.
- Ekyastuti, W., & Setyawati, T. R. (2015). Identification and in Vitro Effectiveness test of Four Isolates of Mercury-resistant Bacteria as Bioaccumulation Agents of Mercury. *Procedia Environmental Sciences*, 28, 258-264.  
<https://doi.org/10.1016/j.proenv.2015.07.033>



- Elika. (2013). *Sustancias indeseables, alimentación animal-Mercurio*.
- Español, S. (2012). Mercury contamination due to mining activities. *Biomédica*, 32(3), 309. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v32i3.1437>
- Essa, A. M. M., Macaskie, L. E., & Brown, N. L. (2002). Mechanisms of mercury bioremediation. *Biochemical Society Transactions*, 30(4), 672-674. <https://doi.org/10.1042/bst0300672>
- Fernández, A., García, C., Saéz, J., & Valdezate, S. (2010). Metodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Seimc*, 37.
- Fitzgerald, W. F., & Mason, R. P. (1996). The Global Mercury Cycle: Oceanic and Anthropogenic Aspects. En W. Baeyens, R. Ebinghaus, & O. Vasiliev (Eds.), *Global and Regional Mercury Cycles: Sources, Fluxes and Mass Balances* (pp. 85-108). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-1780-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-94-009-1780-4_3)
- Fortunato, R., Crespo, J. G., & Reis, M. A. M. (2005). Biodegradation of thiomersal containing effluents by a mercury resistant *Pseudomonas putida* strain. *Water Research*, 39(15), 3511-3522. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.06.012>
- GAD de Portovelo. (2014). *PLAN DE DESARROLLO Y ORDENAMIENTO TERRITORIAL*. 117.
- Galantini, J. A., & Suñer, L. (2008). Las fracciones orgánicas del suelo: Análisis en los suelos de la Argentina. *AgriScientia*, 25(1). <https://doi.org/10.31047/1668.298x.v25.n1.2740>
- Galo, R., & León, I. (2016). *Evaluación de la medicago sativa l (alfalfa), cecropia peltata l (guarumo) y arachis pintoi w.c (maní forrajero) como potenciales especies fitorremediadoras para remediación de suelos contaminados por minería aurífera en las riveras del río Nambija, barrio Puente azul, cantón Zamora* [Investigación]. Universidad Nacional de Loja.



- Gaona, X. (2004). El mercurio como contaminante global. Desarrollo de metodologías para su determinación en suelos contaminados y estrategias para la reducción de su liberación al medio ambiente. *Departamento de Química, Unidad de Química Analítica, Universidad Autónoma de Barcelona.*
- García, C., Moreno, J. L., Hernández, M. T., & Polo, A. (2002). *Metales pesados y sus implicaciones en la calidad del suelo.* CSIC - Centro de Ciencias Medioambientales (CCMA). <https://digital.csic.es/handle/10261/111812>
- Garzón, J. M., & Rodríguez, J. P. (2015). Gestión ambiental de aguas residuales industriales con mercurio proveniente de la minería aurífera a nivel mundial: Estado del arte. *Universidad y Salud, 17*(1), 13.
- Giovanella, P., Cabral, L., Costa, A. P., de Oliveira Camargo, F. A., Gianello, C., & Bento, F. M. (2017). Metal resistance mechanisms in Gram-negative bacteria and their potential to remove Hg in the presence of other metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety, 140*, 162-169.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.02.010>
- Gobernado, M., & López-Hontangas, J. L. (2003). Identificación bacteriana. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 21*, 54-60.
- González, M. (2005). Recuperación de suelos contaminados con metales pesados utilizando plantas y microorganismos rizosféricos. *Terra Latinoamericana, 23*(1), 29-37.
- Gracia, L., Marrugo, J., & Alvis, E. (2010). Contaminación por mercurio en humanos y peces en el municipio de Ayapel, Córdoba, Colombia, 2009. *Revista Facultad Nacional de Salud Pública, 28*(2), 118-124.
- Granados Pérez, R., & Carmen, V. P. M. (2017). Microbiología. Bacteriología, características y clasificación bacteriana. Virología, características y técnicas



- bioquímicas. *Microbiología. bacteriología, características y clasificación bacteriana. virología, características y técnicas bioquímicas*, 323-323.
- Guerra, M., & Zaldumbide, D. (2010). La agonía del Puyango. *Letras Verdes*, 35-37.
- Guerrero-Rojas, J. J., & Gárate, Z. O. (2013). *BIORREMEDIACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN POR MERCURIO EN MINERÍA INFORMAL*.  
<https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3767.7926>
- Gustin, M. S., Bank, M. S., Bishop, K., Bowman, K., Branfireun, B., Chételat, J., Eckley, C. S., Hammerschmidt, C. R., Lamborg, C., Lyman, S., Martínez-Cortizas, A., Sommar, J., Tsui, M. T.-K., & Zhang, T. (2020). Mercury biogeochemical cycling: A synthesis of recent scientific advances. *Science of The Total Environment*, 737, 139619.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139619>
- Guzmán, B. (2016). *Identificación de Pseudomona Aeruginosa en el equipo de anestesia inhalatoria en 20 clínicas y hospitales veterinarios de la ciudad de Quito mediante estudios microbiológicos* [Investigativo]. Universidad de los Andes.
- Guzzi, G., Ronchi, A., & Pigatto, P. (2021). Toxic effects of mercury in humans and mammals. *Chemosphere*, 263, 127990.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127990>
- He, Z., Siripornadulsil, S., Sayre, R. T., Traina, S. J., & Weavers, L. K. (2011). Removal of mercury from sediment by ultrasound combined with biomass (transgenic *Chlamydomonas reinhardtii*). *Chemosphere*, 83(9), 1249-1254.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.03.004>



- Hernández, R. (2013). *Aislamiento y caracterización de bacterias resistentes a mercurio de suelo de de Idrija, Eslovenia*. [Investigación]. Universidad de Querétaro.
- Hidalgo, R. B. (2008). *Identificación de bacterias del género Vibrio asociadas al cultivo de la almeja. Caracterización y patogénesis*. Univ Santiago de Compostela.
- Huang, C.-C., Chen, M.-W., Hsieh, J.-L., Lin, W.-H., Chen, P.-C., & Chien, L.-F. (2006). Expression of mercuric reductase from *Bacillus megaterium* MB1 in eukaryotic microalga *Chlorella* sp. DT: An approach for mercury phytoremediation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(1), 197-205. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0250-0>
- Ibáñez, J. (2011). El Concepto de Suelo, Su Clasificación y Representaciones Canónicas. *Suelos Ecuatoriales*, 41, 19-22.
- Irawati, W., Patricia, Soraya, Y., & Baskoro, A. H. (2012). A Study on Mercury-Resistant Bacteria Isolated from a Gold Mine in Pongkor Village, Bogor, Indonesia. *HAYATI Journal of Biosciences*, 19(4), 197-200. <https://doi.org/10.4308/hjb.19.4.197>
- Jara, P. (2012). Impacto de las actividades mineras sobre la biodiversidad de los ecosistemas de páramo en los Andes Sur de Ecuador. *CEA*.
- Johs, A., Eller, V. A., Mehlhorn, T. L., Brooks, S. C., Harper, D. P., Mayes, M. A., Pierce, E. M., & Peterson, M. J. (2019). Dissolved organic matter reduces the effectiveness of sorbents for mercury removal. *Science of the Total Environment*, 690, 410-416. Scopus. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.001>



- Koller, M., & Saleh, H. M. (2018). Introductory Chapter: Introducing Heavy Metals. En H. E.-D. M. Saleh & R. F. Aglan (Eds.), *Heavy Metals*. InTech.  
<https://doi.org/10.5772/intechopen.74783>
- Kotwal, D. R., Shewale, N. B., Thakare, M. J., & Bholay, A. D. (2018). BIOREMEDIATION OF MERCURY USING MERCURY RESISTANT BACTERIA. *Research Journal of Life Sciences, Bioinformatics, Pharmaceutical and Chemical Sciences*, 4(2).
- Kumari, S., Amit, Jamwal, R., Mishra, N., & Singh, D. K. (2020). Recent developments in environmental mercury bioremediation and its toxicity: A review. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 13, 100283.  
<https://doi.org/10.1016/j.enmm.2020.100283>
- Le, D. L., & Terry, N. (2005). Phytoremediation of toxic trace elements in soil and water. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 32(11-12), 514-520.  
<https://doi.org/10.1007/s10295-005-0227-0>
- Lee, S. E., Chung, J. W., Won, H. S., Lee, D. S., & Lee, Y.-W. (2012). Removal of Methylmercury and Tributyltin (TBT) Using Marine Microorganisms. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 88(2), 239-244.  
<https://doi.org/10.1007/s00128-011-0501-y>
- Liu, S., Wang, X., Guo, G., & Yan, Z. (2021). Status and environmental management of soil mercury pollution in China: A review. *Journal of Environmental Management*, 277, 111442. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111442>
- Lominchar, M., Sierra, M., Rodríguez, J., & Millán, R. (2014). Estudio del comportamiento y distribución del mercurio presente en muestras de suelo recogidas en la ribera del río Valdeazogues. *Informes Técnicos Ciemat*.



- López, M., Santos, J., Quezada, C., Segura, M., & Pérez, J. (2016). Actividad minera y su impacto en la salud humana. *Revista Ciencia UNEMI*, 9(17), 92-100.
- Lozano, Z., Ovalles, F., Hernández, R., Moreno, B., Piñango, L., Gregorio, J., & Bravo, C. (2004). Selección de un diseño de muestreo en parcelas experimentales a partir del estudio de la variabilidad espacial de los suelos. *Bioagro*, 16, 61-72.
- Mahbub, K. R., Bahar, M. M., Labbate, M., Krishnan, K., Andrews, S., Naidu, R., & Megharaj, M. (2017). Bioremediation of mercury: Not properly exploited in contaminated soils! *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(3), 963-976. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8079-2>
- Malakahmad, A., Hasani, A., Eisakhani, M., & Isa, M. H. (2011). Sequencing Batch Reactor (SBR) for the removal of Hg<sup>2+</sup> and Cd<sup>2+</sup> from synthetic petrochemical factory wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 191(1), 118-125. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.04.045>
- Marín, A., Gonzalez, V. H., Lapo, B., Molina, E., & Lemus, M. (2016). Niveles de mercurio en sedimentos de la zona costera de El Oro, Ecuador. *Gayana (Concepción)*, 80(2), 147-153. <https://doi.org/10.4067/S0717-65382016000200147>
- Martí, L., Filippini, M. F., Salcedo, C., Drovandi, A., Troilo, S., & Valdés, A. (2011). Heavy metals evaluation in soils of irrigated oasis of Mendoza Province: I. Total concentrations of Zn, Pb, Cd and Cu. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 19.
- Martínez, E., Fuentes, J. P., & Acevedo, E. (2008). CARBONO ORGÁNICO Y PROPIEDADES DEL SUELO. *Revista de la ciencia del suelo y nutrición vegetal*, 8(1), 68-96. <https://doi.org/10.4067/S0718-27912008000100006>



- Martínez, J. A., & Uribe, A. (2015). El Mercurio y la contaminación por actividad extractiva. *Revista Ontare*, 3(1), 55-76.  
<https://doi.org/10.21158/23823399.v3.n1.2015.1250>
- Matus, F. J., & Maire, C. R. (2000). RELACIÓN ENTRE LA MATERIA ORGÁNICA DEL SUELO, TEXTURA DEL SUELO Y TASAS DE MINERALIZACIÓN DE CARBONO Y NITRÓGENO. *Agricultura Técnica*, 60(2).  
<https://doi.org/10.4067/S0365-28072000000200003>
- Millán, R., Carpena, R., Schmid, T., Sierra, M., Moreno, E., Peñalosa, J., Gamarra, R., & Esteban, E. (2017). Rehabilitación de suelos contaminados con mercurio: Estrategias aplicables en el área de Almadén. *ecosistemas*, 16(2).
- MINAM. (2017). *Decreto Supremo N° 011-2017-MINAM .- Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para Suelo*. Ministerio del Ambiente-MINAM.
- Morais, S., e Costa, F. G., & Lourdes Pereir, M. de. (2012). Heavy Metals and Human Health. En J. Oosthuizen (Ed.), *Environmental Health—Emerging Issues and Practice*. InTech. <https://doi.org/10.5772/29869>
- Morales, I., & Reyes, R. (2003). Mercurio y salud en la odontología. *Revista de Saúde Pública*, 37, 266-272. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102003000200018>
- Muñoz, G. (2017). *Evaluación in vitro de la capacidad de maní forrajero (Arachis pintoi W.C) y guarumo (Cecropia peltata L) en la biorremediación de suelos contaminados con mercurio*. [Investigación]. ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.
- Osores, F., Rojas, J., & Manrique, C. (2012). Minería informal e ilegal y contaminación con mercurio en Madre de Dios: Un problema de salud pública. *Acta Médica Peruana*, 29(1).





- Osorio, N. (2012). Toma de muestras de suelo para evaluar la fertilidad del suelo. *Manejo Integral del Suelo y Nutrición Vegetal*, 1(1).
- Oviedo, A., Moína-Quimí, E., Naranjo-Morán, J., & Barcos-Arias, M. (2017). Contaminación por metales pesados en el sur del Ecuador asociada a la actividad minera. *Bionatura*, 2(4), 437-441. <https://doi.org/10.21931/RB/2017.02.04.5>
- Oviedo, R., Moína, E., Naranjo, J., & Barcos, M. (2017). Contaminación por metales pesados en el sur del Ecuador asociada a la actividad minera. *Bionatura*, 2(4), 437-441. <https://doi.org/10.21931/RB/2017.02.04.5>
- Paisio, C. E., González, P. S., Talano, M. A., & Agostini, E. (2017). Remediación biológica de Mercurio: Recientes avances. *REVISTA LATINOAMERICANA DE BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL Y ALGAL; Vol. 3 Núm. 2 (2012)*. <http://www.solabiaa.org/ojs3/index.php/RELBAA/article/view/38>
- Paternina, R., Pérez, A., & Vitola, D. (2017). Presencia de bacterias rizosféricas resistentes a mercurio en suelos del sur de Bolívar, Colombia. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*, 9(2), 301. <https://doi.org/10.24188/recia.v9.n2.2017.612>
- Pepi, M., Gaggi, C., Bernardini, E., Focardi, S., Lobianco, A., Ruta, M., Nicolardi, V., Volterrani, M., Gasperini, S., Trinchera, G., Renzi, P., Gabellini, M., & Focardi, S. E. (2011). Mercury-resistant bacterial strains *Pseudomonas* and *Psychrobacter* spp. Isolated from sediments of Orbetello Lagoon (Italy) and their possible use in bioremediation processes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(1), 85-91. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.09.006>
- Pérez, M., & Mota, M. (2008). Morfología y estructura microbiana. In: *TEMAS DE BACTERIOLOGÍA Y VIROLOGÍA MÉDICA*, 2008.



- Pinzón, C., & Fajardo, C. (2018). Impacto del mercurio en los ecosistemas colombianos y las técnicas aplicables para su biorremediación. *Working papers - ECAPMA*, 2, 12.
- PROFEPA. (2016). *NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004: Criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados*. Procuraduría Federal de Protección al Ambiente.
- Qiu, G., Feng, X., Li, P., Wang, S., Li, G., Shang, L., & Fu, X. (2008). Methylmercury Accumulation in Rice (*Oryza sativa* L.) Grown at Abandoned Mercury Mines in Guizhou, China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(7), 2465-2468. <https://doi.org/10.1021/jf073391a>
- Ramírez, A. V. (2008). Intoxicación ocupacional por mercurio. *Anales de la Facultad de Medicina*, 69(1), 46-51.
- Raspanti, E., Cacciola, S. O., Gotor, C., Romero, L. C., & García, I. (2009). Implications of cysteine metabolism in the heavy metal response in *Trichoderma harzianum* and in three *Fusarium* species. *Chemosphere*, 76(1), 48-54. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.02.030>
- Rocha, L., Olivero, J., & Caballero, K. R. (2018). IMPACTO DE LA MINERÍA DEL ORO ASOCIADO CON LA CONTAMINACIÓN POR MERCURIO EN SUELO SUPERFICIAL DE SAN MARTÍN DE LOBA, SUR DE BOLÍVAR (COLOMBIA). *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 34(1), 93-102. <https://doi.org/10.20937/RICA.2018.34.01.08>
- Rodríguez, E., Gamboa, M., Hernández, F., & García, D. (2005). *Bacteriología General: Principios Y Prácticas de Laboratorio*. Editorial Universidad de Costa Rica.



- Rubiano, S. (2018). *El mercurio en la minería ilegal de oro en los países del Bioma Amazónico*. FGA-RAISG.
- Ruiz, O. N., Alvarez, D., Gonzalez, G., & Torres, C. (2011). Characterization of mercury bioremediation by transgenic bacteria expressing metallothionein and polyphosphate kinase. *BMC Biotechnology*, 11(1), 82.  
<https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-82>
- Saglam, N., Say, R., Denizli, A., Patir, S., & Arica, M. Y. (1999). Biosorption of inorganic mercury and alkylmercury species on to *Phanerochaete chrysosporium* mycelium. *Process Biochemistry*. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302936947>
- Sánchez, M., González, T., Ayora, T., Evangelista, Z., & Pacheco, N. (2018). *¿Qué son los microbios?* 68, 10-17.
- Santos-Domínguez, E. E., Vargas-Morales, J. M., Cárdenas-González, J. F., & Acosta-Rodríguez, I. (2017). Remoción de Arsénico (V) en Solución Acuosa por Biomasa Modificada del Hongo *Aspergillus niger*. *Información Tecnológica*, 28(6), 45-52. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642017000600006>
- Saranya, K., Sundaramanickam, A., Shekhar, S., Swaminathan, S., & Balasubramanian, T. (2017). Bioremediation of Mercury by *Vibrio fluvialis* Screened from Industrial Effluents. *BioMed Research International*, 2017, 1-6.  
<https://doi.org/10.1155/2017/6509648>
- Selin, N. E. (2009). Global Biogeochemical Cycling of Mercury: A Review. *Annual Review of Environment and Resources*, 34(1), 43-63.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.environ.051308.084314>
- Silva, A., Carvalho, M., Souza, S., Dias, P., Silva Filho, R., Saramago, C., Bento, C., & Hofer, E. (2012). Heavy metal tolerance (Cr, Ag AND Hg) in bacteria isolated



- from sewage. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 43, 1620-1631. <https://doi.org/10.1590/S1517-838220120004000047>
- Sinha, A., & Khare, S. K. (2012). Mercury bioremediation by mercury accumulating *Enterobacter* sp. Cells and its alginate immobilized application. *Biodegradation*, 23(1), 25-34. <https://doi.org/10.1007/s10532-011-9483-z>
- Sulca, M. A., & Alvarado, D. E. (2018). Asociación de la resistencia al mercurio con la resistencia a antibióticos en *Escherichia coli* aislados de la costa de Lima-Perú. *Revista peruana de Biología*, 25(4), 433. <https://doi.org/10.15381/rpb.v25i4.14312>
- Telmer, K. (2007). *Mercury and small scale gold mining—Magnitude and challenges worldwide*. GEF/UNDP/UNIDO Global Mercury Project.
- Toledo, R., & Viciado, D. (2017). *Muestreo de Suelos, Técnicas de Laboratorio e Interpretación de Análisis de Suelos*.
- TULSMA. (2017). *Texto Unificado de Legislación Ambiental «TULSMA» Libro VI Anexo 2 «Norma de Calidad Ambiental del Recurso Suelo y Criterios de Remediación Para Suelos Contaminados»*.
- Vera, J. (2016). *Remoción de mercurio en aguas contaminadas mediante microorganismos tolerantes, una aproximación a la biorremediación microbiana* [Investigación]. Universidad de Santo Tomás.
- Vicien, C., & Paola, M. (2010). *Biorremediación: Vinculaciones entre investigación, desarrollo y legislación*.
- Volke, T., Velasco, A., & de la Rosa, A. (2005). *Suelos contaminados por metales y metaloides: Muestreo y alternativas para su remediación*.



- Wagner-Dobler, I. (2003). Pilot plant for bioremediation of mercury-containing industrial wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62(2-3), 124-133. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1322-7>
- Wei, S., & Zhou, Q. (2008). Screen of Chinese weed species for cadmium tolerance and accumulation characteristics. *International Journal of Phytoremediation*, 10(6), 584-597. <https://doi.org/10.1080/15226510802115174>
- Weinberg, J. (2010). Introducción a la Contaminación por Mercurio para las ONG. *IPEN*.
- Yaguentkovsky, N. (2011). *Aplicación de técnicas de biorremediación para el tratamiento de residuos industriales con alto contenido de metales pesados*. Universidad Nacional de la Plata.
- Yang, L., Zhang, Y., Wang, F., Luo, Z., Guo, S., & Strähle, U. (2020). Toxicity of mercury: Molecular evidence. *Chemosphere*, 245, 125586. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125586>
- Yarto, M., Gavilán, A., & Castro, J. (2014). La contaminación por mercurio en México. *Pennsylvania*, 21-34.
- Zhang, H., Feng, X., Zhu, J., Sapkota, A., Meng, B., Yao, H., Qin, H., & Larssen, T. (2012). Selenium in Soil Inhibits Mercury Uptake and Translocation in Rice (*Oryza sativa* L.). *Environmental Science & Technology*, 120830112421007. <https://doi.org/10.1021/es302245r>



9. ANEXOS

Anexo 1. Concentración de Hg en muestras cercanas a zonas mineras

LABORATORIO DE SANEAMIENTO Panamericana Norte Km. 5 y 1/2. - Cuenca Telf : 4175568		INFORME DE RESULTADOS		Página 1 de 1	
FECHA: 18/03/2020		INFORME N°: 110/02/20			
DATOS PROPORCIONADOS POR EL CLIENTE					
NOMBRE: PACHECO FAJARDO JUAN DIEGO					
SOLICITADO POR: SR. JUAN DIEGO PACHECO					
DIRECCIÓN: ORDOÑEZ LAZO					
MUESTRA					
CÓDIGO: 110/01-02/20					
DESCRIPCIÓN (Fuente): AGUA DE MINERIA					
PROCEDENCIA (Lugar): PORTOVELO					
FECHA DE RECEPCIÓN: 11/03/2020					
ENTREGADAS EN EL LABORATORIO POR: SR. JUAN DIEGO PACHECO					
<b>RESULTADOS</b>					
PARÁMETRO		MÉTODO	FECHA REALIZACIÓN	UNIDAD	MUESTRA 1 110/01/20
MERCURIO		SM 3120 ICP	13/03/2020	ug/l	<6
PARÁMETRO		MÉTODO	FECHA REALIZACIÓN	UNIDAD	MUESTRA 2 110/02/20
MERCURIO		SM 3120 ICP	13/03/2020	ug/l	<6
Atentamente,					

## Anexo 2. Composición e indicaciones generales del Agar MacConkey.

**Britania**

REF B0211405 REF B0211406

# Mac Conkey Agar

IVD

**USO**

Este medio se utiliza para el aislamiento de bacilos Gram negativos de fácil desarrollo, aerobios y anaerobios facultativos a partir de muestras clínicas, aguas y alimentos. Todas las especies de la familia Enterobacteriaceae desarrollan en el mismo.

Su fórmula cumple con los requerimientos de la Armonización de Farmacopeas Europea, Japonesa y de los Estados Unidos de Norteamérica (EP, JP y USP respectivamente).

**FUNDAMENTO**

En el medio de cultivo, las peptonas, aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable, y la mezcla de sales biliares y el cristal violeta son los agentes selectivos que inhiben el desarrollo de gran parte de la flora Gram positiva. El agar es el agente solidificante.

Por fermentación de la lactosa, disminuye el pH alrededor de la colonia. Esto produce un viraje del color del indicador de pH (rojo neutro), la absorción en las colonias, y la precipitación de las sales biliares.

Los microorganismos no fermentadores de lactosa producen colonias incoloras.

**CONTENIDO Y COMPOSICIÓN**

Código B0211405: envase x 100 g.

Código B0211406: envase x 500 g.

**FÓRMULA (en gramos por litro)**

PEPTONA DE CARNE.....	1.5
PEPTONA DE GELATINA.....	17.0
TRIPTEÍNA .....	1.5
LACTOSA.....	10.0
MEZCLA DE SALES BILIARES N°3.....	1.5
CLORURO DE SODIO.....	5.0
ROJO NEUTRO.....	0.03
CRISTAL VIOLETA.....	0.001
AGAR.....	13.5
pH FINAL: 7.1 ± 0.2	

**INSTRUCCIONES**

Suspender 50 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Reposar 5 minutos. Calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición 1 a 2 minutos hasta disolver completamente. Distribuir en recipientes apropiados y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

**CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO**

Medio de cultivo deshidratado: color beige rosado, homogéneo, libre deslizamiento.

Medio de cultivo preparado: color rojizo púrpura.

**ALMACENAMIENTO**

Medio de cultivo deshidratado a 10-35 °C.

Medio de cultivo preparado a 2-8 °C.

**PROCEDIMIENTO****Siembra**

En superficie: inocular directamente la muestra por estría.

En profundidad: inocular una alícuota de la muestra directa o de su dilución. Verter un volumen del medio de cultivo fundido y enfriado a 40-45°C. Homogeneizar mediante movimientos de vaivén y rotación. Dejar solidificar.

**Incubación**

En aerobiosis, a 35-37 °C durante 18-48 horas.

**INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS**

**Microorganismos fermentadores de lactosa:** colonias rosadas-rojizas. Puede observarse halo de precipitación biliar.

**Microorganismos no fermentadores de lactosa:** colonias del color del medio, incoloras.



**Anexo 3. Composición e indicaciones generales del AgarSabourad Dextrose.**

## Agar Dextrosa Sabouraud EP/USP

Para el cultivo de hongos y levaduras.

Cat. 1024

---

**Información práctica**

Aplicaciones	Categorías
Recuento no selectivo	Hongos y levaduras

Industria: Farmacéutica/Veterinaria / Clínica / Alimentación / Cultivo general

Regulaciones: USP / ISO 11133 / Farmacopea Europea

---

**Principios y usos**

Agar Dextrosa Sabouraud se puede utilizar para cultivar levaduras, mohos (como hongos patógenos, particularmente aquellos asociados con infecciones de la piel) y microorganismos acidúricos. Este medio también se usa para determinar el contenido microbiano y fúngico de los cosméticos y para la evaluación micológica de los alimentos.

La fórmula se basa en la Farmacopea Europea. La dextrosa es el carbohidrato fermentable que proporciona carbono y energía. La mezcla de peptona proporciona nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento. El agar bacteriológico es el agente solidificante. La alta concentración de dextrosa y el pH ácido hacen que este medio sea selectivo para los hongos.

Georg et al. demostraron que el agar básico enriquecido con tres antibióticos mejora considerablemente el aislamiento de hongos patógenos de fuentes altamente contaminadas. Para preparar un medio de cultivo selectivo agregar asépticamente lo siguiente por cada litro del medio antes de usar: 0,4 g de cicloheximida; 20 unidades de penicilina; 40 mg de estreptomina.

Se puede obtener un medio de Sabouraud muy rico disolviendo el medio en un litro de infusión de corazón (Cat. 1714).

La Farmacopea Europea recomienda este medio en el párrafo 2.6.12: "Microbiological examination of non – sterile products: Microbial enumeration test" para el examen de TYMC en productos. En el párrafo 2.6.13: "Microbiological examination of non-sterile products: Test for specified microorganisms" para la prueba de Candida albicans en productos.

**Fórmula en g/L**

Dextrosa	40	Agar bacteriológico	15
Mezcla de digerido péptico de tejido animal y pancreático de caseína (1:1)	10		




**Preparación**

Suspender 65 gramos del medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y disolver con calor y agitación frecuente. Hervir durante un minuto hasta la disolución completa. Distribuir en recipientes adecuados y esterilizar en autoclave a 118-121 °C durante 15 minutos. NO SOBRECALENTAR, ya que facilita la hidrólisis de los componentes y que el medio permanezca blando.








Anexo 4. Concentración de la muestra de suelo M1.

 <p>Servicio de Acreditación Ecuatoriano Acreditación N° SAE LEN 13-006 LABORATORIO DE ENSAYOS</p>		<p><b>ANALÍTICA AVANZADA - ASESORÍA Y LABORATORIOS</b> <b>ANAVANLAB CIA. LTDA.</b></p> <p>Matriz: La Primavera I, Leonardo Da Vinci 56-236 y Alberto Durero, Cumbayá. Contactos: 3550852 / 5143303 / servicioalcliente@aaalab.com.ec</p>		 <p>Muestra AAALab No: 21075 Página 1 de 1</p>	
<b>INFORME DE RESULTADOS N° 21075</b>					
<b>1. DATOS GENERALES</b>					
CLIENTE:	PACHECO FAJARDO JUAN DIEGO			TELÉFONO:	0997393277
DIRECCIÓN:	AV. ORDOÑEZ LAZO S/N			ATENCIÓN A:	JUAN PACHECO
<b>2. INFORMACION DE LA MUESTRA</b>		INTEGRIDAD DE LA MUESTRA:	CUMPLE	LUGAR DE TOMA DE MUESTRA:	MINERA
TIPO DE MUESTRA:	OTRO			FECHA DE TOMA DE MUESTRA:	22/10/2020
IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA:	20 - 086 MEDIO DE CULTIVO			RESPONSABLE DE TOMA DE MUESTRA:	CLIENTE
FECHA DE RECEPCIÓN MUESTRA:	23/10/2020			PERÍODO DE REALIZACIÓN DE ANÁLISIS:	23/10/2020 al 30/10/2020
<b>3. RESULTADOS:</b>					
AA	PARAMETRO	METODO ANALITICO	UNIDADES	RESULTADO	**INCERTIDUMBRE + % U
(*)	Mercurio	AAA-PE-S012/ EPA 7061 A / 7471 B, 3051.	mg/L	92,900	20
<b>NOTAS:</b>					
AA (Acreditaciones):		*Interpretaciones fuera del alcance de acreditación SAE		**Los valores de incertidumbre se expresan en porcentaje y se han estimado con K=2, nivel de confianza 95,45%	
1: Ensayos que se encuentran dentro del alcance de acreditación SAE.		N1: No es posible evaluar el cumplimiento debido a que el límite superior del método es inferior a la norma			
(*) Los ensayos marcados con (*) no están incluidos en el alcance de acreditación SAE.		N2: No es posible evaluar el cumplimiento debido a que el límite de cuantificación del método es superior a la norma			
2: Ensayos subcontratados. En el apartado de observaciones se indica el laboratorio subcontratado. ANAVANLAB asume la responsabilidad por los análisis subcontratados.					
3: Ensayos dentro del alcance de acreditación del SAE realizados en Sucursal Avenida 9 de Octubre y Miguel Gamboa esquina, El Coca					
El presente informe solo afecta a la muestra analizada. Procedimiento de Toma de muestra utilizado por ANAVANLAB: AAA-PI-003 / AAA-PI-001					
Si el cliente suministró la muestra, los resultados aplican a la muestra como se recibió.					
<b>4. OBSERVACIONES</b>				<p><b>INFORME APROBADO Y AUTORIZADO POR:</b> L.cda. Alejandra Hidalgo Gerente Técnica ANAVANLAB CIA. LTDA.</p>  <p>Quito, 30 de octubre de 2020</p>	
<p>MC0703-07      Se prohíbe su reproducción total o parcial sin autorización de ANAVANLAB CIA LTDA.</p>					






Anexo 5. Concentración de la muestra de suelo M2.

 <p>Servicio de Acreditación Ecuatoriano Acreditación N° SAE LEN 13-006 LABORATORIO DE ENSAYOS</p>		<p><b>ANÁLITICA AVANZADA - ASESORÍA Y LABORATORIOS</b> <b>ANAVANLAB CIA. LTDA.</b></p> <p>Matriz: La Primavera I, Leonardo Da Vinci 56-236 y Alberto Durero, Cumbayá. Contactos: 3550852 / 5143303 / servicioalcliente@aaalab.com.ec</p>		 <p>Muestra AAALab No: 21074 Página 1 de 1</p>	
<b>INFORME DE RESULTADOS N° 21074</b>					
<b>1.- DATOS GENERALES</b>					
CLIENTE:	PACHECO FAJARDO JUAN DIEGO			TELÉFONO:	0997393277
DIRECCIÓN:	AV. ORDOÑEZ LAZO S/N			ATENCIÓN A:	JUAN PACHECO
<b>2. INFORMACION DE LA MUESTRA</b>		INTEGRIDAD DE LA MUESTRA:	CUMPLE	LUGAR DE TOMA DE MUESTRA:	MINERA
TIPO DE MUESTRA:	OTRO		FECHA DE TOMA DE MUESTRA:	22/10/2020	
IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA:	20 - 085 MINERA		RESPONSABLE DE TOMA DE MUESTRA:	CLIENTE	
FECHA DE RECEPCIÓN MUESTRA:	23/10/2020		PERÍODO DE REALIZACIÓN DE ANÁLISIS:	23/10/2020 al 30/10/2020	
<b>3. RESULTADOS:</b>					
AA	PARAMETRO	METODO ANALITICO	UNIDADES	RESULTADO	**INCERTIDUMBRE + % U
(*)	Mercurio	AAA-PE-S012/ EPA 7061 A / 7471 B, 3051.	mg/L	195,600	20
<b>NOTAS:</b>					
AA (Acreditaciones):		*Interpretaciones fuera del alcance de acreditación SAE		**Los valores de incertidumbre se expresan en porcentaje y se han estimado con K=2, nivel de confianza 95,45%	
1: Ensayos que se encuentran dentro del alcance de acreditación SAE.		N1: No es posible evaluar el cumplimiento debido a que el límite superior del método es inferior a la norma			
(*) Los ensayos marcados con (*) no están incluidos en el alcance de acreditación SAE.		N2: No es posible evaluar el cumplimiento debido a que el límite de cuantificación del método es superior a la norma			
2: Ensayos subcontratados. En el apartado de observaciones se indica el laboratorio subcontratado. ANAVANLAB asume la responsabilidad por los análisis subcontratados.					
3: Ensayos dentro del alcance de acreditación del SAE realizados en Sucursal Avenida 9 de Octubre y Miguel Gamboa esquina, El Caca					
El presente informe solo afecta a la muestra analizada.		Procedimiento de Toma de muestra utilizado por ANAVANLAB: AAA-PI-AD03 / AAA-PI-5001			
Si el cliente suministró la muestra, los resultados aplican a la muestra como se recibió.					
<b>4. OBSERVACIONES</b>				<p><b>INFORME APROBADO Y AUTORIZADO POR:</b> Lcda. Alejandra Hidalgo Gerente Técnica ANAVANLAB CIA. LTDA.</p>  <p>Quito, 30 de octubre de 2020</p>	
<p>MC0703-07 Se prohíbe su reproducción total o parcial sin autorización de ANAVANLAB CIA LTDA.</p>					






Anexo 6. Concentración de Hg del medio líquido en donde se sembró la cepa BN con 100 ppm de HgCl<sub>2</sub>. (R1).

 <p>Acreditación N° SAE LEN 13-006 LABORATORIO DE ENSAYOS</p>		<p>ANÁLITICA AVANZADA - ASESORÍA Y LABORATORIOS ANAVANLAB CIA. LTDA.</p> <p>Matriz: La Primavera I, Leonardo Da Vinci 56-236 y Alberto Durero, Cumbayá. Contactos: 3550852 / 5143303 / servicioalcliente@aalab.com.ec</p>			
				<p>Muestra AAA Lab No: 20825 Página 1 de 1</p>	
<b>INFORME DE RESULTADOS N° 20825</b>					
<b>1.- DATOS GENERALES</b>					
CLIENTE:	PACHECO FAJARDO JUAN DIEGO			TELÉFONO:	0997393277
DIRECCIÓN:	AV. ORDOÑEZ LAZO S/N			ATENCIÓN A:	JUAN PACHECO
<b>2. INFORMACION DE LA MUESTRA</b>		INTEGRIDAD DE LA MUESTRA:	CUMPLE	LUGAR DE TOMA DE MUESTRA:	MEDIO DE CULTIVO LIQUIDO
TIPO DE MUESTRA:	OTRO			FECHA DE TOMA DE MUESTRA:	28/09/2020
IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA:	20 - 263 BN100			RESPONSABLE DE TOMA DE MUESTRA:	CLIENTE
FECHA DE RECEPCIÓN MUESTRA:	29/09/2020			PERÍODO DE REALIZACIÓN DE ANÁLISIS:	28/09/2020 al 07/10/2020
<b>3. RESULTADOS:</b>					
AA	PARAMETRO	METODO ANALITICO	UNIDADES	RESULTADO	**INCERTIDUMBRE + % U
(*)	Mercurio	AAA-PE-S012/ EPA 7061 A / 7471 B, 3051.	mg/L	< 0,005	30
<b>NOTAS:</b>					
AA (Acreditaciones):		*Interpretaciones fuera del alcance de acreditación SAE		**Los valores de incertidumbre se expresan en porcentaje y se han estimado con K=2, nivel de confianza 95,45%	
1: Ensayos que se encuentran dentro del alcance de acreditación SAE.		N1: No es posible evaluar el cumplimiento debido a que el límite superior del método es inferior a la norma			
(*) Los ensayos marcados con (*) no están incluidos en el alcance de acreditación SAE.		N2: No es posible evaluar el cumplimiento debido a que el límite de cuantificación del método es superior a la norma			
2: Ensayos subcontratados. En el apartado de observaciones se indica el laboratorio subcontratado. ANAVANLAB asume la responsabilidad por los análisis subcontratados.					
3: Ensayos dentro del alcance de acreditación del SAE realizados en Sucursal Avenida 9 de Octubre y Miguel Gamboa esquina, El Caca					
El presente informe solo afecta a la muestra analizada.		Procedimiento de Toma de muestra utilizado por ANAVANLAB: AAA-P1-A003 / AAA-P1-S001			
Si el cliente suministró la muestra, los resultados aplican a la muestra como se recibió.					
<b>4. OBSERVACIONES</b>				<b>INFORME APROBADO Y AUTORIZADO POR:</b>	
Resultado de mercurio bajo rango acreditado 0,003 mg/L.		Digitally signed by ANA ALEJANDRA HIDALGO ALVAREZ Date: 2020.10.07 19:20:57 +02:00 Reason: Anavarlab Location: -		Lcda. Alejandra Hidalgo Gerente Técnica ANAVANLAB CIA. LTDA.	
				 Quito, 7 de octubre de 2020	
MC0703-07		Se prohíbe su reproducción total o parcial sin autorización de ANAVANLAB CIA LTDA.			






Anexo 7. Concentración de Hg del medio líquido en donde se sembró la cepa BN con 50 ppm de HgCl<sub>2</sub> (R1)..

 <p>Acreditación N° SAE LEN 13-006 LABORATORIO DE ENSAYOS</p>		<p>ANALÍTICA AVANZADA - ASESORÍA Y LABORATORIOS ANAVANLAB CIA. LTDA.</p> <p>Matriz: La Primavera I, Leonardo Da Vinci 56-236 y Alberto Durrero, Cumbayá. Contactos: 3550852 / 5143303 / servicioalcliente@aaalab.com.ec</p>		 <p>Muestra AAALab No: 20823 Página 1 de 1</p>	
<b>INFORME DE RESULTADOS N° 20823</b>					
<b>1. DATOS GENERALES</b>					
CLIENTE:	PACHECO FAJARDO JUAN DIEGO			TELÉFONO:	0997393277
DIRECCIÓN:	AV. ORDOÑEZ LAZO S/N			ATENCIÓN A:	JUAN PACHECO
<b>2. INFORMACION DE LA MUESTRA</b>					
TIPO DE MUESTRA:	INTEGRIDAD DE LA MUESTRA:	CUMPLE	LUGAR DE TOMA DE MUESTRA:	MEDIO DE CULTIVO LIQUIDO	
IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA:	OTRO		FECHA DE TOMA DE MUESTRA:	28/09/2020	
FECHA DE RECEPCIÓN MUESTRA:	20 - 261 BN50		RESPONSABLE DE TOMA DE MUESTRA:	CLIENTE	
	29/09/2020		PERÍODO DE REALIZACIÓN DE ANÁLISIS:	28/09/2020 al 07/10/2020	
<b>3. RESULTADOS:</b>					
AA	PARAMETRO	METODO ANALITICO	UNIDADES	RESULTADO	**INCERTIDUMBRE +% U
(*)	Mercurio	AAA-PE-S012/ EPA 7061 A / 7471 B, 3051.	mg/L	< 0,005	30
<b>NOTAS:</b>					
AA (Acreditaciones):		*Interpretaciones fuera del alcance de acreditación SAE		**Los valores de incertidumbre se expresan en porcentaje y se han estimado con K=2, nivel de confianza 95,45%	
1: Ensayos que se encuentran dentro del alcance de acreditación SAE.		NI: No es posible evaluar el cumplimiento debido a que el límite superior del método es inferior a la norma			
(*) los ensayos marcados con (*) no están incluidos en el alcance de acreditación SAE.		N2: No es posible evaluar el cumplimiento debido a que el límite de cuantificación del método es superior a la norma			
2: Ensayos subcontratados. En el apartado de observaciones se indica el laboratorio subcontratado. ANAVANLAB asume la responsabilidad por los análisis subcontratados.					
3: Ensayos dentro del alcance de acreditación del SAE realizados en Seguridad Alimentaria 9 de Octubre y Miguel Gamboa esquina, El Coca					
El presente informe solo afecta a la muestra analizada. Procedimiento de Toma de muestra utilizado por ANAVANLAB: AAA-PA003 / AAA-PI-5001					
Si el cliente suministró la muestra, los resultados aplican a la muestra como se recibió.					
<b>4. OBSERVACIONES</b> Resultado de mercurio bajo rango acreditado 0,003 mg/L.				<b>INFORME APROBADO Y AUTORIZADO POR:</b> Loda. Alejandra Hidalgo Gerente Técnica ANAVANLAB CIA. LTDA. Quito, 7 de octubre de 2020	
					
Digitally signed by ANA ALEJANDRA HIDALGO ALVAREZ Date: 2020.10.07 15:18:41 +02:00 Reason: Anavariab Location: -					
MC0703-07 Se prohíbe su reproducción total o parcial sin autorización de ANAVANLAB CIA LTDA.					






Anexo 8. Concentración de Hg del medio líquido en donde se sembró la cepa BA con 50 ppm de HgCl<sub>2</sub> (R1).

 <p>Acreditación N° SAE LEN 13-006 LABORATORIO DE ENSAYOS</p>		<p><b>ANÁLITICA AVANZADA - ASESORÍA Y LABORATORIOS</b> <b>ANAVANLAB CIA. LTDA.</b></p> <p>Matriz: La Primavera I, Leonardo Da Vinci 56-236 y Alberto Durero, Cumbayá. Contactos: 3550852 / 5143303 / servicioalcliente@aanalab.com.ec</p>		 <p>Muestra AAALab No: 20826 Página 1 de 1</p>	
<b>INFORME DE RESULTADOS N° 20826</b>					
<b>1.- DATOS GENERALES</b>					
CLIENTE:	PACHECO FAJARDO JUAN DIEGO		TELÉFONO:	0997393277	
DIRECCIÓN:	AV. ORDOÑEZ LAZO S/N		ATENCIÓN A:	JUAN PACHECO	
<b>2. INFORMACION DE LA MUESTRA</b>					
TIPO DE MUESTRA:	INTEGRIDAD DE LA MUESTRA:	CUMPLE	LUGAR DE TOMA DE MUESTRA:	MEDIO DE CULTIVO LIQUIDO	
IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA:	20 - 250 BA50		FECHA DE TOMA DE MUESTRA:	28/09/2020	
FECHA DE RECEPCIÓN MUESTRA:	29/09/2020		RESPONSABLE DE TOMA DE MUESTRA:	CLIENTE	
			PERÍODO DE REALIZACIÓN DE ANÁLISIS:	28/09/2020 al 07/10/2020	
<b>3. RESULTADOS:</b>					
AA	PARAMETRO	METODO ANALITICO	UNIDADES	RESULTADO	**INCERTIDUMBRE +% U
(*)	Mercurio	AAA-PE-S012/ EPA 7061 A/ 7471 B, 3051.	mg/L	<0,005	30
<b>NOTAS:</b>					
AA (Acreditaciones):		*Interpretaciones fuera del alcance de acreditación SAE		**Los valores de incertidumbre se expresan en porcentaje y se han estimado con K=2, nivel de confianza 95,45%	
1: Ensayos que se encuentran dentro del alcance de acreditación SAE.		N1: No es posible evaluar el cumplimiento debido a que el límite superior del método es inferior a la norma			
(*) los ensayos marcados con (*) no están incluidos en el alcance de acreditación SAE.		N2: No es posible evaluar el cumplimiento debido a que el límite de cuantificación del método es superior a la norma			
2: Ensayos subcontratados. En el apartado de observaciones se indica el laboratorio subcontratado. ANA/ANLAB asume la responsabilidad por los análisis subcontratados.					
3: Ensayos dentro del alcance de acreditación del SAE realizados en Sucursal Avenida 9 de Octubre y Miguel Gamboa esquina, El Coca					
El presente informe solo afecta a la muestra analizada. Procedimiento de Toma de muestra utilizado por ANA/ANLAB: AAA-PH-003 / AAA-PH-5001					
Si el cliente suministró la muestra, los resultados aplican a la muestra como se recibió.					
<b>4. OBSERVACIONES</b>			<b>INFORME APROBADO Y AUTORIZADO POR:</b>		
Resultado de mercurio bajo rango acreditado 0,003 mg/L.			Lda. Alejandra Hidalgo Gerente Técnica ANA/ANLAB CIA. LTDA.		
			 Digitally signed by ANA ALEJANDRA HIDALGO ALVAREZ Date: 2020.10.07 19:21:52 +02:00 Reason: Anavalab Location: -		
MC0703-07			Se prohíbe su reproducción total o parcial sin autorización de ANAVANLAB CIA LTDA.		



Anexo 9. Concentración de Hg del medio líquido en donde se sembró la cepa BA con 50 ppm de HgCl<sub>2</sub> (R1).

 <p>Accreditación N° SAE LEN 13-006 LABORATORIO DE ENSAYOS</p>		<p>ANÁLITICA AVANZADA - ASESORÍA Y LABORATORIOS ANAVANLAB CIA. LTDA.</p> <p>Matriz: La Primavera I, Leonardo Da Vinci S6-236 y Alberto Durero, Cumbayá. Contactos: 3550852 / 5143303 / servicioalcliente@aanlab.com.ec</p>		 <p>Muestra AAALab No: 20824 Página 1 de 1</p>	
<b>INFORME DE RESULTADOS N° 20824</b>					
<b>1. DATOS GENERALES</b>					
CLIENTE:	PACHECO FAJARDO JUAN DIEGO			TELÉFONO:	0997393277
DIRECCIÓN:	AV. ORDOÑEZ LAZO S/N			ATENCIÓN A:	JUAN PACHECO
<b>2. INFORMACION DE LA MUESTRA</b>		INTEGRIDAD DE LA MUESTRA:	CUMPLE	LUGAR DE TOMA DE MUESTRA:	MEDIO DE CULTIVO LIQUIDO
TIPO DE MUESTRA:	OTRO			FECHA DE TOMA DE MUESTRA:	28/09/2020
IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA:	20 - 262 BA100			RESPONSABLE DE TOMA DE MUESTRA:	CLIENTE
FECHA DE RECEPCIÓN MUESTRA:	29/09/2020			PERÍODO DE REALIZACIÓN DE ANÁLISIS:	28/09/2020 al 07/10/2020
<b>3. RESULTADOS:</b>					
AA	PARAMETRO	METODO ANALITICO	UNIDADES	RESULTADO	**INCERTIDUMBRE +% U
(*)	Mercurio	AAA-PE-S012/ EPA 7061 A / 7471 B, 3051.	mg/L	< 0,005	30
<b>NOTAS:</b>					
AA (Acreditaciones):		* Interpretaciones fuera del alcance de acreditación SAE		** Los valores de incertidumbre se expresan en porcentaje y se han estimado con K=2, nivel de confianza 95,45%	
1: Ensayos que se encuentran dentro del alcance de acreditación SAE. NI: No es posible evaluar el cumplimiento debido a que el límite superior del método es inferior a la norma.					
(*) Los ensayos marcados con (*) no están incluidos en el alcance de acreditación SAE. ND: No es posible evaluar el cumplimiento debido a que el límite de cuantificación del método es superior a la norma.					
2: Ensayos subcontratados. En el apartado de observaciones se indica el laboratorio subcontratado. ANAVANLAB asume la responsabilidad por los análisis subcontratados.					
3: Ensayos dentro del alcance de acreditación del SAC realizados en Sucursal Avenida 9 de Octubre y Miguel Gamba esquina, El Coca					
El presente informe solo afecta a la muestra analizada. Procedimiento de Toma de muestra utilizado por ANAVANLAB: AAA-PH-A003 / AAA-PH-5001					
Si el cliente suministró la muestra, los resultados aplican a la muestra como se recibió.					
<b>4. OBSERVACIONES</b>				<b>INFORME APROBADO Y AUTORIZADO POR:</b>	
Resultado de mercurio bajo rango acreditado 0,004 mg/L.				Lcda. Alejandra Hidalgo Gerente Técnica ANA/ANLAB CIA. LTDA.	
				 Digitally signed by ANA ALEJANDRA HIDALGO ALVAREZ Date: 2020.10.07 19:20:14 +02:00 Reason: Anavanelab Location: -	
MC0703-07				Quito, 7 de octubre de 2020	
Se prohíbe su reproducción total o parcial sin autorización de ANAVANLAB CIA LTDA.					



**Anexo 10. Concentración de Hg del medio líquido en donde se sembró la cepa BA con 50 ppm de HgCl<sub>2</sub> (R2).**



**ANÁLITICA AVANZADA - ASESORÍA Y LABORATORIOS  
ANAVANLAB CIA. LTDA.**



Matriz: La Primavera I, Leonardo Da Vinci 56-236 y Alberto Durero, Cumbayá.  
Contactos: 3550852 / 5143303 / servicioalcliente@aanlab.com.ec

Muestra AAALab No: 25546  
Página 1 de 1

**INFORME DE RESULTADOS N° 25546**

<b>1.- DATOS GENERALES</b>			
CLIENTE:	IHTA INGENIERIA HIDRAULICA CÍA. LTDA.	TELÉFONO:	0998364296
DIRECCIÓN:	Calle Sucre y Camilo Ponce	ATENCIÓN A:	DANIELA MATOVELLE

<b>2. INFORMACION DE LA MUESTRA</b>	INTEGRIDAD DE LA MUESTRA:	CUMPLE	LUGAR DE TOMA DE MUESTRA:	NO DISPONIBLE
TIPO DE MUESTRA:	AGUA RESIDUAL		FECHA DE TOMA DE MUESTRA:	07/06/2021
IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA:	BA 50		RESPONSABLE DE TOMA DE MUESTRA:	IHTA INGENIERIA HIDRAULICA
FECHA DE RECEPCIÓN MUESTRA:	08/06/2021		PERÍODO DE REALIZACIÓN DE ANÁLISIS:	08/06/2021 al 15/06/2021

<b>3. RESULTADOS:</b>					
AA	PARAMETRO	METODO ANALITICO	UNIDADES	RESULTADO	**INCERTIDUMBRE + % U
1.	Mercurio	AAA-PE-A023/ SM 3114 C, 3112 B. EPA 3015	mg/L	1,9600	NA

<b>NOTAS:</b>		
<b>AA (Acreditaciones):</b>	*Interpretaciones fuera del alcance de acreditación SAE	**Los valores de incertidumbre se expresan en porcentaje y se han estimado con K=2, nivel de confianza 95,45%
1: Ensayos que se encuentran dentro del alcance de acreditación SAE.	N1: No es posible evaluar el cumplimiento debido a que el límite superior del método es inferior a la norma	
[*] Los ensayos marcados con (*) no están incluidos en el alcance de acreditación SAE.	N2: No es posible evaluar el cumplimiento debido a que el límite de cuantificación del método es superior a la norma	
2: Ensayos subcontratados. En el apartado de observaciones se indica el laboratorio subcontratado. ANAVANLAB asume la responsabilidad por los análisis subcontratados.		
3: Ensayos dentro del alcance de acreditación del SAE realizados en Sucursal Avenida 9 de Octubre y Miguel Gamboa esquina, El Coto		
El presente informe solo afecta a la muestra analizada. Procedimiento de Toma de muestra utilizado por ANAVANLAB: AAA-PI-A001 / AAA-PI-0001		

Si el cliente suministró la muestra, los resultados aplican a la muestra como se recibió.

<b>4. OBSERVACIONES</b>	<b>INFORME APROBADO Y AUTORIZADO POR:</b> Lcda. Alejandra Hidalgo Gerente Técnica ANAVANLAB CIA. LTDA.	
	Digitally signed by ANA ALEJANDRA HIDALGO ALVAREZ Date: 2021.06.18 00:17:48 +02'00' Reason: Anavanlab Location: -	Quito, 15 de junio de 2021

MC0703-07

Se prohíbe su reproducción total o parcial sin autorización de ANAVANLAB CIA.LTDA.



Anexo 11. Concentración de Hg del medio líquido en donde se sembró la cepa BA con 100 ppm de HgCl<sub>2</sub> (R2).



ANÁLITICA AVANZADA - ASESORÍA Y LABORATORIOS  
ANAVANLAB CIA. LTDA.

Matriz: La Primavera I, Leonardo Da Vinci 56-236 y Alberto Durero, Cumbayá.  
Contactos: 3550852 / 5143303 / servicioalcliente@aanlab.com.ec



Muestra AAALab No: 25547  
Página 1 de 1

**INFORME DE RESULTADOS N° 25547**


<b>1.- DATOS GENERALES</b>			
CLIENTE:	IHTA INGENIERIA HIDRAULICA CÍA. LTDA.	TELÉFONO:	0998364296
DIRECCIÓN:	Calle Sucre y Camilo Ponce	ATENCIÓN A:	DANIELA MATOVELLE

<b>2. INFORMACION DE LA MUESTRA</b>	INTEGRIDAD DE LA MUESTRA:	CUMPLE	LUGAR DE TOMA DE MUESTRA:	NO DISPONIBLE
TIPO DE MUESTRA:	AGUA RESIDUAL		FECHA DE TOMA DE MUESTRA:	07/06/2021
IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA:	BA 100		RESPONSABLE DE TOMA DE MUESTRA:	IHTA INGENIERIA HIDRAULICA
FECHA DE RECEPCIÓN MUESTRA:	08/06/2021		PERÍODO DE REALIZACIÓN DE ANÁLISIS:	08/06/2021 al 15/06/2021

<b>3. RESULTADOS:</b>					
AA	PARAMETRO	METODO ANALITICO	UNIDADES	RESULTADO	**INCERTIDUMBRE + % U
1	Mercurio	AAA-PE-A023/ SM 3114 C, 3112 B. EPA 3015	mg/L	0,6800	NA

<b>NOTAS:</b>		
<b>AA (Acreditaciones):</b>	*Interpretaciones fuera del alcance de acreditación SAE	**Los valores de incertidumbre se expresan en porcentaje y se han estimado con K=2, nivel de confianza 95,45%
1: Ensayos que se encuentran dentro del alcance de acreditación SAE.	N1: No es posible evaluar el cumplimiento debido a que el límite superior del método es inferior a la norma	
(*) Los ensayos marcados con (*) no están incluidos en el alcance de acreditación SAE.	N2: No es posible evaluar el cumplimiento debido a que el límite de cuantificación del método es superior a la norma	
2: Ensayos subcontratados. En el apartado de observaciones se indica el laboratorio subcontratado. ANAVANLAB asume la responsabilidad por los análisis subcontratados.		
3: Ensayos dentro del alcance de acreditación del SAE realizados en Sucursal Avenida 9 de Octubre y Miguel Gamboa esquina, El Coca		
El presente informe solo afecta a la muestra analizada. Procedimiento de Toma de muestra utilizado por ANAVANLAB: AAA-PI-A003 / AAA-PI-5001		

Si el cliente suministró la muestra, los resultados aplican a la muestra como se recibió.

<b>4. OBSERVACIONES</b>	<p><b>INFORME APROBADO Y AUTORIZADO POR:</b> Lcda. Alejandra Hidalgo Gerente Técnica ANAVANLAB CIA. LTDA.</p> 
	<p>Digitally signed by ANA ALEJANDRA HIDALGO ALVAREZ Date: 2021.06.16 00:18:20 +0200 Reason: Anavanlab Location: - Quito, 15 de junio de 2021</p>

MC0703-07

Se prohíbe su reproducción total o parcial sin autorización de ANAVANLAB CIA LTDA.





**Anexo 12. Concentración de Hg del medio líquido en donde se sembró la cepa BN con 100 ppm de HgCl<sub>2</sub> (R2).**



**ANÁLITICA AVANZADA - ASESORÍA Y LABORATORIOS  
ANAVANLAB CIA. LTDA.**

Matriz: La Primavera I, Leonardo Da Vinci 56-236 y Alberto Durrero, Cumbayá.  
Contactos: 3550852 / 5143303 / servicioalcliente@aaalab.com.ec



Muestra AAALab No: 25548

Página 1 de 1

**INFORME DE RESULTADOS N° 25548**

<b>1.- DATOS GENERALES</b>			
CLIENTE:	IHTA INGENIERIA HIDRAULICA CÍA. LTDA.	TELÉFONO:	0998364296
DIRECCIÓN:	Calle Sucre y Camilo Ponce	ATENCIÓN A:	DANIELA MATOVELLE

<b>2. INFORMACION DE LA MUESTRA</b>	INTEGRIDAD DE LA MUESTRA:	CUMPLE	LUGAR DE TOMA DE MUESTRA:	NO DISPONIBLE
TIPO DE MUESTRA:	AGUA RESIDUAL		FECHA DE TOMA DE MUESTRA:	07/06/2021
IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA:	BN 100		RESPONSABLE DE TOMA DE MUESTRA:	IHTA INGENIERIA HIDRAULICA
FECHA DE RECEPCIÓN MUESTRA:	08/06/2021	PERÍODO DE REALIZACIÓN DE ANÁLISIS:	08/06/2021 al 15/06/2021	

<b>3. RESULTADOS:</b>					
AA	PARAMETRO	METODO ANALITICO	UNIDADES	RESULTADO	**INCERTIDUMBRE + % U
1	Mercurio	AAA-PE-A023/ SM 3114 C, 3112 B. EPA 3015	mg/L	2,8500	NA

<b>NOTAS:</b>		
AA (Acreditaciones):	*Interpretaciones fuera del alcance de acreditación SAE	**Los valores de incertidumbre se expresan en porcentaje y se han estimado con K=2, nivel de confianza 95,45%
1: Ensayos que se encuentran dentro del alcance de acreditación SAE.	N1: No es posible evaluar el cumplimiento debido a que el límite superior del método es inferior a la norma	
(*): Los ensayos marcados con (*) no están incluidos en el alcance de acreditación SAE.	N2: No es posible evaluar el cumplimiento debido a que el límite de cuantificación del método es superior a la norma	
2: Ensayos subcontratados. En el apartado de observaciones se indica el laboratorio subcontratado. ANAVANLAB asume la responsabilidad por los análisis subcontratados.		
3: Ensayos dentro del alcance de acreditación del SAE realizados en Sucursal Avenida 9 de Octubre y Miguel Gamboa esquina, El Coca		
El presente informe solo afecta a la muestra analizada. Procedimiento de Toma de muestra utilizado por ANAVANLAB: AAA-PI-001 / AAA-PI-5001.		

Si el cliente suministró la muestra, los resultados aplican a la muestra como se recibió.

<b>4. OBSERVACIONES</b>	<b>INFORME APROBADO Y AUTORIZADO POR:</b> Lcda. Alejandra Hidalgo Gerente Técnica ANAVANLAB CIA. LTDA.	
	Digitally signed by ANA ALEJANDRA HIDALGO ALVAREZ Date: 2021.06.18 01:15:02 +02'00' Reason: Anavaniab Location: - Quito, 15 de junio de 2021	

MC0703-07

Se prohíbe su reproducción total o parcial sin autorización de ANAVANLAB CIA LTDA.




**Anexo 13. Concentración de Hg del medio líquido en donde se sembró la cepa BB con 50 ppm de HgCl<sub>2</sub> (R2).**

3. RESULTADOS:					
AA	PARAMETRO	METODO ANALITICO	UNIDADES	RESULTADO	**INCERTIDUMBRE + % U
1	Mercurio	AAA-PE-A023/ SM 3114 C, 3112 B. EPA 3015	mg/L	0,9500	NA

**NOTAS:**

AA (Acreditaciones):	*Interpretaciones fuera del alcance de acreditación SAE	**Los valores de incertidumbre se expresan en porcentaje y se han estimado con K=2, nivel de confianza 95,45%
1: Ensayos que se encuentran dentro del alcance de acreditación SAE.	N1: No es posible evaluar el cumplimiento debido a que el límite superior del método es inferior a la norma	
(*): Los ensayos marcados con (*) no están incluidos en el alcance de acreditación SAE.	N2: No es posible evaluar el cumplimiento debido a que el límite de cuantificación del método es superior a la norma	
2: Ensayos subcontratados. En el apartado de observaciones se indica el laboratorio subcontratado. ANAVANLAB asume la responsabilidad por los análisis subcontratados.		
3: Ensayos dentro del alcance de acreditación del SAE realizados en Sucursal Avenida 9 de Octubre y Miguel Gamboa esquina, El Caca		
El presente informe solo afecta a la muestra analizada.	Procedimiento de Toma de muestra utilizado por ANAVANLAB: AAA-PI-A001 / AAA-PI-5001	

Si el cliente suministró la muestra, los resultados aplican a la muestra como se recibió.

4. OBSERVACIONES	INFORME APROBADO Y AUTORIZADO POR: Lcda. Alejandra Hidalgo Gerente Técnica ANAVANLAB CIA. LTDA. Quito, 15 de junio de 2021
	 <small>Digitally signed by ANA ALEJANDRA HIDALGO ALVAREZ Date: 2021.06.16 00:18:45 +02:00 Reason: Anavantab Location:</small>

MC0703-07

Se prohíbe su reproducción total o parcial sin autorización de ANAVANLAB CIA LTDA.