



# **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL**

**Facultad de Ingeniería Marítima y Ciencias del Mar**

**“CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS  
METALOFIJADORAS DE MERCURIO, A TRAVÉS DE LA  
SUBUNIDAD 16sRNA, MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR-  
DGGE DEL RIO GALA (AGUAS ABAJO EN EL RECINTO  
SAN RAFAEL) EN LA PARROQUIA TENGUEL”**

**PROYECTO DE GRADUACION:**

**Previa la obtención del título de:**

**INGIENERO ACUICULTOR**

**Presentado por:**

**LLIVISACA CONTRERAS SUSANA ALEXANDRA**

**VARGAS PÉREZ JEFFREY DAVID**

**Guayaquil – Ecuador**

**2010**

# DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a Carmen y a Cuenca, mis padres, que debido a su apoyo y por haber creído en mí, les digo de todo corazón, que esto es suyo. También incluyo a mis hijas Camila y Sara que han sido la inspiración para poder culminar mi carrera, además, por el tiempo que les arrebaté, el mismo que les pertenecía entero a ellas, y que no pude brindárselos. Agradezco a mis amigos Jeffrey y Lizette, mi leal grupo de estudio y de amistad verdadera. Por último pero no menos especial a mi queridísimo M.Sc Jerry.

Susana      Alexandra      Llivisaca  
Contreras.

# DEDICATORIA

Dedico el siguiente trabajo a mis padres, Jorge y Francia que fueron el motor que me incentivo a seguir estudiando, a mis hermanos, amigos, en especial a Lizette y Susana y profesores. Y en un agradecimiento muy especial para el Sr. Jerry Landivar Zambrano que me brindo un gran apoyo durante toda mi vida académica en la ESPOI.

Jeffrey Vargas Pérez

# AGRADECIMIENTO

“A mis padres José y Carmita

A mis hermanos

A mis amigos y

A mis profesores.”

Susana Alexandra

Llvisaca Contreras.

# AGRADECIMIENTO

“A mis padres Jorge y Francia

A mis hermanos

A mis amigos y

A mis profesores,”

Jeffrey Vargas Pérez

## TRIBUNAL DE GRADUACION

---

M.Sc. Jerry Landivar Z  
Presidente

---

Dra. Francisca Burgos  
Directora

---

Dr. Marcelo Muñoz N.  
Evaluador

---

M.Sc. Ecuador Marcillo G.  
Evaluador

# **DECLARACIÓN EXPRESA**

La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL.

Susana A. Llivisaca Contreras

Jeffrey D. Vargas Pérez

## RESUMEN

El proyecto sobre el cual tratamos, se refiere el uso de las técnicas moleculares PCR-DGGE, para la caracterización de bacterias del género pseudomonas, dada su potencial existencia en las aguas del río Gala de la parroquia Tenguel, debido a su alto grado de contaminación en la que se encuentra este, contamos casi con certeza, la presencia de microorganismos con capacidad metalofijos, además de que sus características biológicas y bioquímicas con las que cuenta la ya nombrada bacteria, les permiten ser viables en ese tipo de entornos.

Para hacer posible la realización a futuro de este proyecto, hemos plasmado los distintos procedimientos de las técnicas necesarias para ese fin. Esta es una iniciativa que el país debe tomar en consideración, razón por la cual, la contaminación en aguas, suelo y aire cada vez se hace más innegable, cuyo acrecentamiento es algo que todos deseamos que pare, pero que pocos realizan con la seriedad que se debería.

El estudio va dirigido al cuidado de la salud de esta población, y demás zonas aledañas a ese sitio, A más de los pobladores los mineros también obtendrán un beneficio, puesto que las bacterias obtenidas, podrían realizar los procesos de



tratamiento de efluentes, y así reducir los costos que la remediación ambiental conlleva. De seguro será copia para otras zonas que tengan problemas similares. La aplicación del mismo, probablemente dure entre unos cuatro a seis años, desde el momento que se lo pone en práctica, pero no se puede negar que en algún momento debemos implementarlo, si no queremos quedarnos sin recursos naturales de los cuales se provee el ecuatoriano.

Una vez reunidos estos perfiles, sin duda alguna con ayuda de la técnica DGGE, podemos utilizar medios estadísticos que de manera clara y ágil nos dictará los cambios en el comportamiento, que afectan a estos micro-ecosistemas, proporcionándonos caracterizaciones en cuanto a la estructura poblacional y la dinámica.

Empezaríamos con un sencillo muestreo en el río Gala, seguido por un análisis microbiológico, mediante el cual aislaremos las bacterias metalo-fijadoras, para alcanzar la caracterización de dichos microorganismos utilizando las herramientas necesarias en conjunto con los procedimientos y técnicas que el DGGE sugiere, y así lograr obtener una fiel base de datos para que esté a disposición de personas interesada en la biorremediación.

## ABREVIATURAS

DGGE.....	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
PCR.....	Polymerase Chain Reaction
AND.....	Ácido desoxirribonucleico
HgCl <sub>2</sub> .....	Cloruro de mercurio
HgS.....	sulfuro de mercurio
ug:.....	microgramo
ul.....	microlitro
mg.....	miligramo
NAD+.....	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
NADP.....	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADH.....	Dinucleótido de nicotinamida adenina
Cel/ml.....	Células por mililitro
mg/l.....	Miligramo por litro
Ag.....	Plata
As.....	Arsénico
Co.....	Cobalto
Cu.....	Cobre
Hg.....	Mercurio
Pb.....	Plomo
EPA.....	Environmental Protection Agency
CuSO <sub>4</sub> .....	Sulfato de cobre (II)
UFC/ml ó UFC/g.....	Unidades formadoras de colonias por mililitro o gramo
pH.....	Potencial de hidrogeno
ppm.....	Partes por millón
C.....	Concentración
V.....	Volumen

# INDICE GENERAL

Dedicatoria .....	II
Agradecimiento .....	III
Tribunal de Graduación.....	IV
Declaración Expresa .....	V
Resumen.....	VI
Indice General .....	IX
Indice de Abreviaturas.....	VIII
Indice de Cuadros .....	X
Indice de Figuras .....	XI
Introducción .....	1

---

	Pag.
<b>CAPITULO 1</b>	
- 1.1 Objetivos.....	4
- 1.2 Objetivos específicos. ....	4
- 1.3 Justificación. ....	5
<b>CAPITULO 2</b>	
- 2.1 Antecedentes .....	10
- 2.2 Marco teórico .....	21
<b>CAPITULO 3</b>	
- 3.1 Metodología .....	47
<b>CAPITULO 4</b>	
- 4.1 Análisis del proyecto .....	69
- 4.2 Interpretación de resultados .....	70
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>71</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>72</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>84</b>

## INTRODUCCION

En la presente investigación, se refiere al tema de la Caracterización de bacterias metalofijadoras de mercurio, presentes en las aguas del Río Gala (aguas abajo en el recinto San Rafael), en la parroquia Tenguel, y que mediante la técnica de PCR-DGGE a través de su subunidad 16s RNA, para trabajos futuros de bioremediación de aguas contaminadas por metales pesados causados por la industria y la minería. Debido al alto desarrollo de la actividad industrial, la contaminación al medio ambiente y la destrucción de la flora y fauna de los ríos del Ecuador, es importante la ejecución de proyectos de investigación para establecer técnicas para remediar todo el daño ambiental causado durante estas últimas décadas.

La característica principal de esta investigación, es proporcionar la información necesaria para poder realizar futuros trabajos relacionados con la búsqueda de microorganismos, con la finalidad de ser utilizados como maquinaria en procesos de remediación biológica. Cuya razón, es el desarrollo minero de esa zona, puesto que posee los ríos más contaminados del sur del país, y según, datos obtenidos del río Gala en sus aguas, ya no se encuentran peces, y la calidad de las mismas no es apta para el consumo humano, gracias a las altas concentraciones de metales pesados, entre ellas podemos citar las mas

mortales como el plomo y el arsénico que se encuentran disueltas en la columna de agua, y conlleva a consecuencias graves cuando la misma es ingerida (REF). El interés de este proyecto, es determinar la presencia de bacterias metalofijadoras del género pseudomona en el agua, por su característica biológica estas bacterias presentan un gran rango de resistencia a metales pesados, entre estos el mercurio, y un grupo pequeño de estas tienen capacidad metalofijadoras y metaloreductoras. Además, proporcionará una base para la realización de proyectos futuros de similares características, pudiendo aumentar el número de géneros de bacterias metalofijadoras para efectos de bioremediación, y como tratamiento de efluentes contaminados. Esta caracterización de bacterias del río Gala tiene como fin, el otorgar a los pobladores la seguridad, de una rápida recuperación de las condiciones del agua a su estado original, de esta manera reduciremos los impactos de salud causados por la contaminación. El beneficio ambiental que va contribuir esta investigación, es el de proporcionarnos información fundamental para la realización de métodos de remediación de aguas contaminadas por metales pesados, declinando los compuestos tóxicos presentes en las agua, utilizando bacterias propias del medio, sin recurrir a la adición de especies extranjeras, que a largo plazo podrían desplazar a las especies bacterianas residentes de la zona, de esta forma podremos ejecutar este tipo de tratamiento a los efluentes de las minerías y demás industrias que produzcan estos compuestos.

El marco teórico se lo realizó revisando una serie de libros y publicaciones científicas basadas en el mismo principio que tiene este proyecto, varias de estas investigaciones detallaban la presencia de bacterias del género *Pseudomonas* en el agua, que mediante experimentos y pruebas, determinaban la capacidad de las mismas para resistir y fijar metales pesados. En la mayoría de la investigación, se pudo determinar la utilización de una bacteria, la *Pseudomonas aeruginosa*, que son organismos que presentan estas características. Las investigaciones se basaban en la colección de muestras de agua contaminada, que mediante unos métodos de filtración, eran incubadas y luego aisladas en medios cultivos selectivos, una vez obtenida la cepa resistente, estas serán caracterizadas y aisladas, las cuales se las sometía a prueba de resistencia al mercurio a diferentes concentraciones, mediante la técnica de PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), que consiste en un rastreo molecular utilizando fragmento de genes ribosomales, previamente realizando una extracción y purificación de ADN de las muestras obtenidas. El material genético extraído colocado en un gel de agarosa y mediante una tinción se puede establecer la longitud, y distribución de las bandas. Gracias a esta distribución y a la aplicación de índices de diversidad, se podrá determinar la presencia de las bacterias de interés.

# **CAPITULO 1**

## **1.1 OBJETIVO**

Caracterizar mediante la técnica PCR-DGGE, las bacterias del género pseudomonas presentes en las aguas contaminadas con mercurio en el Río Gala (aguas abajo en el recinto San Rafael), en la parroquia Tenguel”

## **1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Determinar la presencia de bacterias metalofijadoras del género pseudomona, en las aguas del río Gala por medio del DGGE.
2. Caracterizar cepas aisladas dentro de los géneros pseudomonas mediante la caracterización química, implementando medios de cultivos

selectivos, pruebas de resistencia y fijación de mercurio.

3. Extraer ADN a partir de las cepas de pseudomonas con capacidad metalofijadora, y con lo cual se procederá a la caracterización de las mismas.
4. Por medio de los valores arrojados por los indicadores, determinaremos la estructura poblacional bacteriana.

### **1.3 JUSTIFICACION**

Desde sus inicios, la industria minera ha sido una fuente importante de ingresos y de trabajo para el país, gracias al desarrollo de la misma, debemos el incremento de la tasa de empleo. La minería informal contribuye con la contaminación de los cuerpos de agua, mediante sus efluentes sin previo tratamiento, proveen compuestos tóxicos y metales pesados generados por este tipo de minería contaminando los ríos, y alterando la biodiversidad presente en estos ecosistemas de manera negativa. El río Gala, del recinto San Rafael, parroquia Tenguel, en la provincia del Guayas, era un lugar de



actividades turísticas y de pesca pero por la contaminación, dejó de serlo, ahora, es un lugar donde sus aguas causan enfermedades a los pobladores, y la pesca no se desarrolla por la extinción de algunas las especies en dicha zona.

En el 2007, estudios realizados de Medio Ambiente del Municipio de Guayaquil determinaron que las aguas del río Gala se encuentran contaminadas con mercurio y arsénico disueltos en el agua, y por otros componentes como: cromo, mercurio, cobre, arsénico, vanadio, níquel y cobalto en sus sedimentos. Esto es un problema crítico que se presenta hoy en día en el río, esta contaminación no solo afecta al sector anteriormente nombrado, es el denominador común en los ríos que se encuentran en las zonas mineras. Y por consiguiente, la recuperación de la flora y de la fauna de los mismos. El presente estudio, tiene como objeto determinar la presencia de microorganismos en el río, que fijen los principales metales disueltos en el agua como son el mercurio y el arsénico. Implementarlos como biorreductores para futuros proyectos, puesto que los metales que fijan son muy tóxicos y mortales.

El beneficio del proyecto será, buscar un microorganismo capaz de retirar el mercurio o el arsénico disueltos en el agua, contribuyendo enormemente a la recuperación de las condiciones iniciales de las aguas, no solo del río Gala, si

no que de todos los ríos que se encuentran en las mismas condiciones por causa de la industria.

Los pobladores de la zona serán altamente beneficiados con este proyecto, y que recuperar las condiciones del río, implica una reducción de las enfermedades producidas por las aguas contaminadas, y recuperación de la pesca artesanal de la zona. A más de los pobladores, los mineros también obtendrán un beneficio de este proyecto, con la obtención de las bacterias, podrían realizar proceso de tratamiento de efluentes, reduciendo los costos que la remediación ambiental conlleva.

La presencia de mercurio y arsénico en la columna de agua, los microorganismos pueden generar, en ellos, mecanismos biológicos de absorción o transformación de los metales por parte de estas bacterias. El género *pseudomona*, es un grupo de bacterias Gram-negativa, de gran actividad remediadora, debido que ellas, realizan procesos de reducción y transformación de hidrocarburos y compuestos contaminantes en el medio.

Para la caracterización de bacterias, se implementará la técnica DGGE, la cual

es ampliamente usada en Biorremediación, tratamiento de Aguas Residuales, tratamiento de agua potable, Formación de bio-películas, identificación de contaminantes microbianos. Esta técnica, permite el reconocimiento del microorganismo a través de un sistema de huella digital. Además, permite evaluar la factibilidad del uso de los microorganismos seleccionados, mediante sistemas de monitoreo a bajo costo, que determinarán la estabilidad y el éxito de estos microorganismos en los ecosistemas de trabajo.

La técnica molecular DGGE es rápida, y nos proveerá de un perfil de la diversidad genética de una comunidad bacteriana presente en el río Tenguel. Estos perfiles se caracterizan por la posición (ausencia o presencia de amplicones particulares), el número e intensidad relativa de los amplicones, donde cada especie distinta se encontrará representada por un determinado amplicón. Este método no sólo permite la identificación de las bacterias, sino también la cuantificación de las mismas en la muestra, exponiendo la dominancia relativa de alguna especie bacteriana específica.

Conocemos, que apenas, de 0.1 a 10% de la población bacteriana total, es la proporción de células cultivables en medios convencionales. El uso de DGGE, nos provee de información mucho más confiable de la diversidad bacteriana real

de una muestra. Razones por las cuales, se están reemplazando todos los métodos tradicionales por métodos moleculares para el estudio y análisis de comunidades bacterianas.

La técnica DGGE se fundamenta en la discriminación de dos cadenas dobles de ADN de igual tamaño, pero con diferencias en cuanto a su secuencia, así la energía necesaria para llegar a su desnaturalización es diferente. Esto nos permite definir una cantidad aproximada de fragmentos de ADN de igual tamaño que tienen secuencias con diferente contenido de GC.

Estos perfiles se caracterizan por la posición (ausencia o presencia de amplicones particulares), el número e intensidad relativa de los amplicones, donde cada especie distinta se encontrará representada por una determinada un amplicón. Colectando estos perfiles, los podremos utilizar en métodos estadísticos, que rápidamente pueden proporcionarnos una caracterización de la estructura poblacional y la dinámica, si se realizan estudios espacio temporales en la misma zona de muestreo varias veces.

## **CAPITULO 2**

### **2.1 ANTECEDENTES**

En la actualidad existen serios problemas de contaminación ambiental localizados a nivel de agua, suelo y aire como consecuencia del desarrollo industrial. Las industrias generan una serie de contaminantes que alteran las condiciones normales de los sistemas biológicos, llegando en unos casos a ser problemas irreversibles. La recuperación de estos sistemas contaminados puede ser tratada con diferentes métodos que pueden ser físicos, químicos y biológicos. Siendo los tratamientos físicos y químicos, los más costosos, mientras que la remediación biológica o la biorremediación se presenta como una técnica de recuperación más barata, comparada con los anteriores. Estas técnicas utilizan microorganismos presentes en el propio medio para realizar la tarea de la depuración de las aguas y suelos contaminados.

Los procesos de biorremediación emplean células vivas, biomasas, biopolímeros absorbentes y una variedad de hongos, algas y bacterias que son, hoy en día, utilizados como bioabsorbentes de metales pesados. Muchas investigaciones se han realizado para determinar los efectos de los metales pesados en bacterias de cultivo, y en las poblaciones naturales microbianas.

El mecanismo de resistencia para metales pesados, ha sido estudiado en *E. Coli*, en *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*s. De esta última se han realizado estudios realizados en muestras aisladas de lagos, plantas de tratamientos, efluentes industriales. La *Pseudomonas aeruginosa*, es la bacteria más utilizada para realizar bioensayos, de modo que, detecta concentraciones bajas de metales pesados en agua. Este tipo de bacteria es utilizada ampliamente, debido, principalmente, a su presencia mayoritaria en aguas contaminadas, y es un efectivo parámetro para determinar riesgos en la salud.

En un estudio realizado, se efectuó el análisis de las muestras representativas de seis lagos en Muskoka, en la provincia de Ontario, en Canada, la elección de estos lagos se dio, a la documentación del Ministerio del Medio Ambiente local, determinó que contenían altas concentraciones de mercurio en sus aguas. Esta documentación demuestra, que las pseudomonas presentes en estos lagos,

contenían el mayor porcentaje de resistencia al mercurio, a diferencia de otros lagos con menor concentración del mismo. Indicando que se encontraban aproximadamente 20 a 30 aislados colectados en las playas de cinco de los seis lagos (REF). Los aislados de pseudomonas presentaban casi el mismo porcentaje de resistencia, que los aislados de pseudomonas presentes en los efluentes de las plantas de tratamiento del alcantarillado. Así, se estableció una correlación entre los serotipos, y los tipos de fagos entre las *P. aeruginosa* presente en los cinco lagos y en el alcantarillado [1].

En conclusión determinaron que el 65 % de los aislados que presentan resistencia al mercurio provienen de los sedimentos. Las *P. aeruginosa* presentaba una serie de mecanismos diferentes para la resistencia al mercurio, ella también exhibe resistencia múltiple, no solo para el mercurio, sino también para el arsénico y cadmio. La resistencia al cadmio se presentaba como una reconfiguración de su membrana generando una impermeabilidad para dicho compuesto. Se pudo descubrir otros mecanismos, entre ellos, la presencia de un metabolito capaz de transformar  $HgCl_2$  en mercurio metálico [1].

Los genes que determinan la resistencia hacia el mercurio, no son cromosómicos. Estableciéndose que presentan un factor de traslado de

resistencia, estos genes pueden contener también genes asociados a la resistencia de cobalto, níquel y cadmio, así como genes para la resistencia de antibióticos. Aunque algunos científicos certifican que los genes de resistencia de metales, se encuentran mediados por los genes encargados de la resistencia de antibióticos [1].

Al igual que las *P. aeruginosas*, existen otras bacterias capaces de reducir el mercurio y este grupo de bacterias son utilizadas en los laboratorios para tratamiento de aguas contaminadas. Las bacterias *Pseudomonas putidas*, son bacterias que se presentan en los sedimentos, y en los suelos con mayor porcentaje que las *P. aeruginosa*, estas bacterias también presentan acción metalorreductoras de mercurio, y está ampliamente utilizadas en tratamientos de suelos contaminados (REF).

En fabricas productoras de Cloralcali (una sustancia química que contiene cloro y que se usa en el procesamiento químico), en procesos de elaboración de amalgamas presenta un mayor uso de mercurio. Antes las aguas de desecho en los procesos de elaboración de amalgamas, eran vertidas directamente en el rio y lagos. En muestras de lagos aledaños a la zona de descarga se pudieron aislar las bacterias de tipo *P. putida* en zonas donde la concentración de

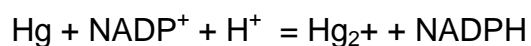


mercurio era de 50 ug de mercurio por litro. Los aislados fueron identificados por la unidad 16s ribosomal de la secuencia de DNA. En el experimento la máxima concentración de HgCl transformada por la *P. putida* fue de 70mg/ por litro, en medio sólido y 10 mg/litros en medio líquido (REF). Los niveles de mercurio son determinados por “flameless cold vapor absorption spectroscopy”, método que determina el contenido de mercurio presente en muestras de 5 ml, las muestras deben de ser diluidas hasta concentraciones de 100 ug por litros. La remoción de mercurio por parte de las bacterias en esta zona, fue realizada en tres muestras separadas A, B y C. En la muestra A se presenta una eficiencia de remoción del 97% , en la muestra B (Tabla 6), se determinó la máxima eficiencia en la remoción del mercurio que tenía en flujo de salida 3mg/l mientras en la entrada se determinó concentraciones de 50 a 60 ug/litro [2].

### **Máxima capacidad de reducción de mercurio.**

El nivel de resistencia de mercurio, es mayor en medio sólido, que en medio líquido, la determinación depende de la densidad bacteriana. La máxima concentración de mercurio registrada para la reducción del mismo por bio-filtros de bacterias metalofijadoras se encuentra entre 7 a 9 mg/l [2].

Para la remoción del mercurio existen métodos químicos que nos permiten eliminar o transformar el mercurio en compuestos menos tóxicos. Estos métodos consisten en tratar de forma biológica, física y química, agua contaminada con mercurio, a las cuales se les agregaban sustancias como fosfato monobásico de potasio, fosfato dibásico de potasio, sulfato de amonio como sustancia de crecimiento (Figura 2). Mediante un método mecánico, que es la aireación se procedía a realizar el proceso de detoxificación de forma físico-química. Para el proceso de detoxificación biológica se utilizaron bacterias resistentes al mercurio en un mix. Esto generaba que las bacterias aeróbicas por mecanismos enzimáticos reducían el ion mercurio, hacia mercurio volátil, por efecto de las mercurio reductasas [3].



El elemento resultante es fácilmente removido por el medio de crecimiento. En altas concentraciones de mercurio, se presentaban una alta congregación de precipitados de mercurio como: el Hidróxido de mercurio, Óxido de mercurio, compuestos que presentan una solubilidad baja. El birreactor era ineficiente para trabajar en concentraciones exorbitantes de mercurio que se encontraban entre 20 a 30 mg/ [4].

La tasa de crecimiento de la *Pseudomona aeruginosa* y la tasa de destoxificación se determinaba, utilizando “low-inoculum batch cultures”. La concentración inicial de células está ajustada aproximadamente 100 cel/ml y una concentración inicial de mercurio menos de 2 microgramos de Hg<sup>2</sup> por ml. La destoxificación del mercurio era determinada por la viabilidad de las células [5].

El mercurio es un compuesto químico ampliamente distribuido alrededor de la tierra. Muchas formas de mercurio son tóxicas para los seres vivos. Pero existen organismos capaces de resistir la toxicidad del mercurio y de degradar algunas formas químicas de este metal, contribuyendo en procesos normales del ciclo global del mercurio en el medio ambiente. Se han determinado cinco tipos de mecanismos de resistencia para los compuestos de mercurio, siendo el mecanismo de resistencia de mercurio inorgánico el más estudiado. La resistencia al mercurio de este tipo de bacterias se encuentra relacionada por los genes del “mer operón” localizados en los plásmidos de las bacterias. Este estudio ha demostrado que se encuentra presente tanto en bacterias Gram-positivas como en Gram-negativas. Estudios determinaron que las resistencias a este metal, varían, por las regiones y zonas geográficas, además se determina que sus antepasados adoptaron este mecanismo en respuesta a las emisiones de mercurio generadas por las erupciones volcánicas [6].

Los organismos mévalo-resistentes a los metales generalmente son organismos termófilos y acidófilos. Las bacterias presentan genes que permiten el transporte de metales como nutrientes esenciales para el crecimiento de las bacterias, y como mantenimiento del equilibrio intracelular.

En estudios realizados sobre la **Resistencia a metales pesados**, se determinó que las bacterias y hongos son los que presentan una mayor tolerancia hacia niveles altos de metales. Las muestras obtenidas fueron colocadas en medios de crecimiento multi-metal que contenía Ag, As, Bi, Cd, Cr, Co, Cu, Hg, Li, Mo, Pb, Sn, and Zn por diferentes a diferente concentración de metal en disoluciones. Las muestras fueron analizadas por espectrofotometría. Después de dejar incubar las muestras, se obtuvo un total de 72 aislados de las que contenían una contracción de metales de  $10^{-7}$ , Luego estas muestras fueron re-incubadas en concentraciones de  $10^{-6}$  con 58 aislados, a  $10^{-5}$  con 50 aislados, a  $10^{-4}$  con 31 aislados y 16 aislados a  $10^{-3}$ . Lo que indica que los microorganismos presenta una residencia a los metales y su efectividad en procesos de remediación va a depender de la concentración de los metales contaminantes y a condiciones físicas del medio. Puesto que, las bacterias presentes en los aislados con la concentración  $10^{-3}$  son las más aptas para implementarlas en procesos de biorremediación. [7].

## **Diseño de un bio-filtro a escala de banco para la bio-destoxificación de mercurio (Hg), mediante la utilización de microorganismos (*Pseudomonas aeruginosa*).**

Frente a los problemas presentados por la presencia del mercurio en las aguas, los microorganismos pueden ser bio-detoxificadores muy eficientes de metales solubles y particulados, especialmente a partir de concentraciones externas diluidas, por esto, las tecnologías basadas en los microorganismos ofrecen una alternativa ayudando a las técnicas convencionales para la eliminación y recuperación de metales (**Ehrlich, L. 1997**). A partir de lo anterior se desarrollo la investigación basada en un diseño de bio-filtración, el cual se define como todo proceso biológico utilizado para el control o tratamiento de compuestos volátiles orgánicos e inorgánicos presentes en la fase líquida y gaseosa. Los microorganismos son los responsables de la degradación biológica de los contaminantes volátiles contenidos en corrientes de agua residual [8].

Al identificar los puntos de descargas directas sobre el humedal, tomamos la zona identificada. La metodología de laboratorio se desarrollo en seis etapas:

1. La primera, consistió en la caracterización de las propiedades físico-químicas del sistema acuático.

2. En la segunda etapa, se aislaron colonias típicas de *Pseudomona* de las muestras colectadas en campo en dos diferentes medios de agar (agar f y King B), de la muestra tomada se inocularon 10ml al 90% de medio de cultivo.
3. La tercera etapa se refiere a las pruebas bioquímicas, las cuales consistieron en tres pruebas presuntivas y tres pruebas confirmativas para la detección de *Pseudomona aeruginosa*.
4. La cuarta etapa, consistió en la determinación de la concentración de mercurio tomando concentraciones de  $\text{HgCl}_2$  al 0,7%, 1,0% y 2,0%, con el fin de realizar el escalamiento de volúmenes mínimos de capacidad bio-detoxicadora.
5. En la quinta etapa, se construyó a escala de banco un bio-filtro aerobio de arrastre por gravedad tomando como base los estudios de (**Calderón, 1999**). Utilizando como soportes, evaluados en términos de volumen de saturación, porosidad, y densidad, el carbón mineral, turba, escoria y aserrín.

6. Por último, a los medios de soporte, del bio-filtro con una concentración  $\text{HgCl}_2$  (Cloruro de Mercurio II-), al 2%, se inoculo *Pseudomona aeruginosa* por medio de aspersión, con el propósito de determinar la obtención de una bio-película sobre cada uno de los medios; obteniendo en cada uno de ellos, excepto, el aserrín una película blanquecina delgada.[8].

Cuyos resultados resaltan, que la mayor eficiencia en la remoción se presentó cuando la cepa de *P. aeruginosa* fue inmovilizada en turba, alcanzando porcentajes del 97%. Considerando este resultado, se concluye que puede ser posible la utilización de materiales de desecho como la turba, para lograr la formación de bio-películas por parte de *P. aeruginosa*, a temperatura de 20°C y recirculación permanente.

En la inoculación de cepas de *Pseudomona aeruginosa* sobre los medios de soporte, se obtuvo una bio-película, que fue evaluada durante ocho días, haciendo seguimiento al crecimiento de los microorganismos sobre los lechos filtrantes, la cual se hizo cada vez más visible a excepción del aserrín. Lo cual indicó que existe un consorcio microbiano que puede crecer en estos soportes, donde las *Pseudomonas aeruginosas* presentaron una alta bio-acumulación, reportándose en las concentraciones finales de mercurio al final del sistema.[8].

## 2.2 MARCO TEORICO

En la actualidad, existen serios problemas de contaminación ambiental localizados en todos los niveles, como: agua, suelo y aire por consecuencia del desarrollo industrial. Que genera una serie de contaminantes que alteran las condiciones normales de los sistemas biológicos, llegando, en unos casos a ser problemas irreversibles.

Según el EPA, la "contaminación del ambiente" significa contaminaciones debido a la descarga (en cualquier medio medioambiental), ó el escape de cualquier sustancia de algún proceso, que sea capaz de causar el daño al hombre o cualquier otro organismo viviente presente en el ambiente”

La recuperación de estos sistemas contaminados puede ser recuperada mediante tratamientos de remediación como son los métodos físicos, químicos y biológicos. Siendo los tratamientos físicos y químicos los más costosos mientras que las remediación biológica o la biorremediación se presenta como una técnica de recuperación más barata comparada con los anteriores, y en las cuales implementan microorganismos nativos para realizar la tarea de la



depuración de las aguas y suelos contaminados. Si pensáramos en la calidad del agua, seguramente vendría a nuestra mente la idea de que el agua “ideal” es aquella formada solamente por hidrógeno y oxígeno, es decir aquella que responda a la archiconocida fórmula:  $H_2O$ . Sin embargo el agua encontrada en estado natural nunca está en estado puro, sino que presenta sustancias disueltas y en suspensión. Estas sustancias pueden limitar, de modo igualmente natural, el tipo de usos del agua. En la naturaleza, el agua adquiere una variedad de constituyentes orgánicos e inorgánicos.

Inorgánicos: son aportados mediante el contacto con el ambiente: contacto con la atmósfera (gases), contacto con la tierra (minerales), y contacto con ambientes contaminados por el hombre. La lluvia disuelve los gases presentes en la atmósfera entre ellos: nitrógeno, oxígeno, dióxido de carbono y dióxido de azufre. En su circulación por encima y a través de la corteza terrestre, el agua reacciona con los minerales del suelo y de las rocas, lo que le aporta principalmente sulfatos, cloruros, bicarbonatos de sodio y potasio, y óxidos de calcio y magnesio. Las actividades humanas aportan una variada gama de componentes inorgánicos, que llegan a los cuerpos de agua por escurrimientos o por vertidos directos. Orgánicos: son aportados por escurrimientos que han estado en contacto con vegetación recayente, con excremento de animales o

en desechos de la vida acuática. En las últimas décadas, el desarrollo de la minería acuífera que se localiza en los sectores de las estribaciones externas de las cordilleras de los andes, han desarrollado un acelerado, desordenado e incontrolado crecimiento industrial, y al mismo tiempo generan grandes daños al ambiente como la contaminación del aire por la evaporación de mercurio, aguas contaminadas por grandes descargas de este metal, cianuro y sólidos que contienen metales pesados. Además, de efectos ambientales, también se han generado problemas sociales como la presencia de poblaciones mineras, que carecen de servicios elementales y se encuentran expuestas a un peligro de contaminación. En la época de los 70, el sector industrial creció de forma acelerada, situándose las industrias en Quito y Guayaquil y en menor escala en Cuenca. Lo que ha incrementado en estas ciudades grandes condiciones de contaminación de los recursos hídricos por compuestos químicos y metales, al aire por emisión de gases y los suelos por desechos industriales. Los ríos y esteros que cruzan entre estas ciudades soportan una gran capacidad de compuestos contaminantes, debido, a un descuidado control de las aguas negras, que son vertidas sin tratamiento alguno a los ríos y esteros.

En los últimos años, el deterioro ambiental en el país, los problemas legales, institucionales, económicos que no estimulan la gestión ambiental, ciencia y

tecnología, participación de la población civil, educación, no presenta una política educativa e informativa en materia ambiental, información y participación de la población civil [9].

En los estudios realizados por el departamento de gestión ambiental del municipio de Guayaquil, gracias al monitoreo realizado el 27 de Diciembre del 2007, en el Río Gala, aguas abajo del (recinto san Rafael), demostraban que sus aguas se encontraban contaminadas por mercurio y arsénico de acuerdo a los criterios de calidad admisibles para la preservación de la flora y fauna en agua dulce, según Libro VI Anexo I del texto unificado de la legislación ambiental secundaria, determinó, la presencia de contaminantes en los sedimentos como: cromo, mercurio, cobre, arsénico, vanadio, níquel y cobalto. De los cuales el mercurio, arsénico y vanadio superaban en 24.14, 12 y 7.12 veces el límite máximo permisible, determinado por los criterios de calidad del agua. En el río Gala, aguas abajo, se presenta una contaminación en menor grado, en sus sedimentos [10].

El Ministerio de Energía y Minas, es responsable de las políticas y manejo de los recursos energéticos del Ecuador, sus funciones se estructuran sobre el concepto de promover el desarrollo armónico y sustentable de los sectores

energético y minero del país. Las funciones del Ministerio son las de regular, controlar y fiscalizar las operaciones hidrocarburíferas y mineras, promover la inversión nacional y extranjera, precautelando los intereses del Estado Ecuatoriano. La actividad minera en la zona examinada, data de más de treinta años. Existe un estudio de Monitoreo Ambiental de las Áreas Mineras en el Sur de Ecuador llamado Sub-componente 3.1, ejecutado por la Swedish Environmental System (SES) durante el período de 1996 a 1998. La compañía indica que la contaminación relacionada con las actividades mineras en el sur del Ecuador, ha sido monitoreada, y el impacto evaluado, durante 5 ocasiones en los años 1996-1998. Los estudios incluyeron 4 áreas de Ponce Enríquez, Santa Rosa, Portovelo – Zaruma y Nambija. Los principales medios investigados fueron agua de ríos y estuarios, sedimentos de río y fauna acuática.

Los resultados del monitoreo indicaron, que la minería, ha causado considerables impactos ambientales, siendo más severos los de las áreas Portovelo-Zaruma y Ponce Enríquez. Los principales contaminantes son cianuro, metales pesados y mercurio. Las fuentes más importantes de los contaminantes son los relaves descargados directamente o indirectamente en los ríos, por los sistemas inadecuados de disposición. La descarga de los

contaminantes, ha causado la extinción de toda la fauna acuática superior en ciertos tramos de ríos. Además, en varios lugares, la mala calidad del agua imposibilita su uso para el consumo humano, irrigación o criaderos acuáticos. Los metales pesados y el mercurio, son incorporados al medio con vida (biótico) de los ríos y estuarios afectados, sin embargo, el impacto de la minería en otras actividades económicas, como la producción de bananas y el cultivo de camarones, según ese estudio de 1998, es considerada insignificante. El mismo estudio señala que si los relaves fueran confinados en diques de retención adecuados, se podrían solucionar esencialmente todos los problemas referentes a la contaminación con metales pesados, determinándose como prioritario para la mitigación los ríos Puyango, Siete y Gala Chico. Entre las principales empresas mineras de se encuentran aledañas al río Gala están:

- **QUEBRADA FRIA**

Cuencas: Río Chico y Gala

Superficie: 308 hectáreas mineras.

- **COOPERATIVA MINERA BELLA RICA**

Ubicación: Cantones Pucará y Ponce Enríquez

Cuencas: Río Chico y Gala

Superficie: 1300 hectáreas mineras.

- **CONCESION TUQUITO 3**

Cuenca: Tenguel

Área concesionada: 64 hectáreas mineras.

- **ANDREINA**

Ubicación: Parroquia Tenguel

Cuencas: Río Gala

Superficie: 36 hectáreas mineras.

### **DISPOSICIONES ESPECÍFICAS PARA LA MINERÍA:**

A continuación se presenta las disposiciones y leyes a favor de la preservación del ambiente.

**3.11. Ley de Minería:** Ley No 126. Registro Oficial Suplemento No 695 del 31 de mayo de 1991. Art. 79. Estudios de impacto ambiental. Los titulares de concesiones mineras y de plantas de beneficio, fundición y refinación, deberán afectar estudios de impacto ambiental y planes de manejo ambiental para

prevenir, mitigar, controlar, rehabilitar y compensar los impactos ambientales y sociales derivados de sus actividades, estudios que deberán ser aprobados por la Subsecretaría de Medio Ambiente del Ministerio de Energía y Minas.

Art. 81. Tratamiento de aguas. Los titulares de derechos mineros que utilicen aguas para sus trabajos deben devolverlas al cauce original del río o a la cuenca del lago o laguna de donde fueron tomadas, libres de contaminación para que no se afecte a la salud humana o al desarrollo de la flora y fauna.

**3.12. Reglamento Ambiental de Actividades Mineras.** Decreto Ejecutivo No 625,

Registro Oficial No 151 de 12 de septiembre de 1997.

Art. 3. Objeto. El presente Reglamento tiene por objeto promover el desarrollo sustentable de la minería en el Ecuador, a través del establecimiento de normas y procesos para prevenir, controlar, mitigar, rehabilitar y compensar los efectos que las actividades mineras puedan tener sobre el medio ambiente y la sociedad.

Art. 10. Clasificación. Para los fines establecidos en la Ley de Minería y el presente reglamento, los estudios orientados a una gestión ambientalmente adecuada de la actividad minera, que están obligados a presentar los titulares de derechos mineros y las entidades del sector público que realicen actividades

mineras, a la Subsecretaría de Protección Ambiental del Ministerio de Energía y Minas, por intermedio de las Direcciones Regionales de Minería de la correspondiente jurisdicción, se clasifican en:

- a) Evaluación Preliminar de Impacto Ambiental;
- b) Evaluación de Impacto Ambiental; y,
- c) Auditoría Ambiental.

Art. 61. Amalgamación. Cuando el proceso de recuperación mineral contemple el uso de mercurio, deberá realizarse acatando estrictamente las Normas para la utilización de Mercurio en la Actividad Minera, establecidas mediante Acuerdo Ministerial No 338, publicado en el Registro Oficial No 286, del 29 de septiembre de 1989. En todo caso, se utilizarán cilindros amalgamadores, retortas, reactivadores de mercurio y principalmente equipos de protección personal. Se evitará, por todos los medios, el contacto directo de los trabajadores con este elemento. El mercurio antes y después de su uso, deberá ser cuidadosamente almacenado y guardado en recipientes herméticamente cerrados, para evitar su fuga. Se prohíbe terminantemente el uso directo de mercurio en molinos de cualquier tipo y en canalones. Los efluentes producidos en la etapa de amalgamación deberán ser recolectados y almacenados en reservorios impermeabilizados, los mismos que al cierre de las operaciones serán rehabilitados de acuerdo a lo establecido en los estudios ambientales.



**3.13. Reglamento General Sustitutivo del Reglamento General de la Ley de Minería.** Decreto Ejecutivo No. 1415, Registro Oficial No 307 de 17 de abril del 2001. Art. 1. Interés Nacional Prioritario. La actividad minera, de utilidad pública e interés nacional prioritario, se considera fundamental para el desarrollo sostenible, armónico y equilibrado del país.

#### **De la Protección al Medio Ambiente**

Art. 67. Evaluación y aprobación de los estudios ambientales. Los estudios, programas, planes de manejo, auditorías y presupuestos ambientales, que presenten los titulares de derechos mineros respecto de sus concesiones mineras o plantas de beneficio, fundición y refinación, serán evaluados por la Unidad Ambiental Minera de la Dirección Nacional de Minería y aprobados por la Subsecretaría de Protección Ambiental del Ministerio de Minas y Petróleos misma que se encargará del seguimiento de velar por el cumplimiento de los estudios ambientales, directamente o a través de firmas auditoras independientes, calificadas [11].

#### **SOBRE LA CONTAMINACIÓN HÍDRICA**

El artículo 14 inciso segundo, del Reglamento Ambiental para actividades mineras dice: *“Ampliación de estudios: Las actividades adicionales que se describen en estos estudios de evaluación de impactos ambientales ampliatorios, sólo podrán iniciarse una vez que estos sean aprobados por la Subsecretaría de Protección Ambiental”*

El artículo 11 literal c) de la Ley de Minería, expresa que para ejecutar las actividades mineras en lagos, lagunas y embalses o en sitios destinados a la captación de agua para las poblaciones y en distancias de hasta 200 metros medidos horizontalmente desde los mismos, se requiere de informes otorgados por las siguientes autoridades e instituciones, la Corporación para el Desarrollo de la Región de las Provincias de Azuay, Cañar y Morona Santiago, Centro de Reconversión Económica de las Provincias del Azuay, Cañar y Morona Santiago CREA.. Para el caso del área de ubicación del dique construido en la concesión “Las Paralelas”, para la retención de las colas, no cuenta con los informes mencionados. Los principales problemas ambientales del recurso agua en las concesiones examinadas, hacen referencia a la contaminación generada por la descarga de las aguas residuales provenientes de la exploración y explotación de las minas, se realiza la acumulación y conservación de los relaves en sitios que no reúnen los mínimos requisitos ambientales nacionales y mundiales para su funcionamiento, es así que las aguas superficiales de las llamadas “colas”

por proceso de decantación generan aguas contaminadas, las cuales caen en otra piscina de relaves, se repite este fenómeno y luego esta agua residual se descarga directamente a la primera fuente de agua de drenaje natural, las cuales constituyen verdaderas alcantarillas abiertas que recogen en sus cauces la descarga de los interceptores de aguas residuales domésticas de sus respectivas áreas de drenaje. En especial, el río Chico, tributario del Tenguel, en el tramo localizado dentro de la concesión Las Paralelas, la Unidad Ambiental Minera, el concesionario procedió a la construcción de un dique localizado en la cuenca del río Chico. La Subsecretaría Ambiental del Ministerio emitió por dos ocasiones informes de paralización de los trabajos y retiro del dique, solicitando la suspensión de la construcción, no obstante, se ha hecho caso omiso de estas disposiciones habiéndose culminado los trabajos, encontrándose represado su contenido y a punto de desbordarse.

En consecuencia, los ríos materia de análisis, con excepción del Gala, cuyo mayor recorrido es limpio debido a la intervención de la comunidad de “El Shumiral”, conjuntamente con la Fundación Ecológica “Defensores del Río Gala”, presentan en sus tramos hasta su desembocadura en el mar, condiciones ambientales no aceptables, pestilencia permanente y riesgo para la salud de los habitantes ribereños, debido a las concentraciones de contaminación química

por metales pesados, además de la carga de materiales sólidos suspendidos como consecuencia de la actividad de las canteras y gravilleras.

Desde el punto de vista geográfico, la zona de las cuencas de los ríos motivo de análisis, constituyen las más importantes zonas extractivas del Ecuador, con el 70% de las explotaciones. La zonas motivo de estudio, comprenden Municipios como los que se mencionan a continuación: del río Caluguro y Santa Rosa al Municipio de Santa Rosa, Río Siete, Municipio de El Guabo, Río Tenguel y Gala, Municipio de Ponce Enríquez, en su parte Alta y en su parte baja el Municipio de Guayaquil.

En estas áreas se geo-referenciaron, con la utilización del GPS y de la estación de referencia que posee el Ministerio de Energía y Minas, 10 industrias, la minería y las actividades relacionadas con ella, consideradas como industrias fundamentalmente degradadoras del ambiente. En las zonas de minería se presenta la ocurrencia de avalanchas de residuos mineros, materiales arenosos y lodosos que taponan tuberías y cubren caminos y galerías. Igualmente el impacto sobre el paisaje, la calidad del aire y la calidad del agua son muy altos. Las minas y canteras se convierten en amenaza para asentamientos que han crecido paralelo a las explotaciones [12].

Dado el crecimiento de la industria minera, produjo grandes impactos al ambiente, como la introducción de metales pesados a los efluentes, entre ellos los más tóxicos como el Arsénico y el Mercurio. El mercurio es el metal pesado más tóxico de los demás y es uno de los compuestos riesgosos para la salud. Normalmente el mercurio presenta una presencia normal en el medio, pero la actividad antropológica ha incrementado la concentración de este compuesto en el medio. El mercurio puede permanecer en el medio acuoso, en los sedimentos y presente dentro del sistema de organismos superiores como en peces o mamíferos [13].

Reportes indican que las concentraciones de mercurio en peces marinos y de agua dulce exceden los valores de salud pública internacionalmente recomendados. Además, se ha estimado que el 95 % del mercurio total en peces puede corresponder a metilmercurio ( $\text{CH}_3\text{Hg}$ ). Esta forma química es tres veces más tóxica que el mercurio elemental y las sales inorgánicas. Por otro lado la exposición a metilmercurio en humanos proviene casi exclusivamente del consumo de peces (Olivero y Johnson, 2002).

### **Ciclo del mercurio.**

El mercurio está presente en el medio ambiente de diversas formas y su

transformación de una forma a otra puede ocurrir tanto en sedimento, agua y aire, siendo catalizada por variados sistemas biológicos. Los conocimientos acerca del ciclo bio-geoquímico del mercurio a nivel mundial, se han incrementado considerablemente en los últimos años. En la atmósfera está ampliamente distribuido en forma de gas y partículas. Entre el 90-95 % de este elemento es gaseoso. El mercurio existe en cuatro estados de oxidación:  $\text{Hg}_0$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Hg}_2^{2+}$  y  $\text{Hg}_4^{4+}$ . Este último estado ha sido descubierto recientemente en el 2007. El estado de oxidación  $\text{Hg}^{2+}$  es el más estable del mercurio. Las tres primeras especies se considera que coexisten en el equilibrio así todo el mercurio inorgánico disuelto en aguas oceánicas existe en forma disociada como ion  $[\text{HgCl}_2]^-$ . En las fuentes de agua continentales, sin embargo, donde hay poco cloruro el mercurio puede existir como  $\text{Hg}(\text{OH})_2$ .

La interconversión en medio acuoso entre distintos estados de oxidación del mercurio requiere la presencia de microorganismos. El mercurio es emitido a la atmósfera a partir de fuentes naturales y antropogénicas en forma de vapor elemental ( $\text{Hg}_0$ ), posteriormente precipitado por las lluvias que lo depositan en los cuerpos de agua y finalmente en el sedimento desde donde es metilado y luego bio-acumulado (Downs et al., 1998). Las formas más solubles de mercurio (por ejemplo  $\text{Hg}^{2+}$ ), son sintetizadas a través de la conversión de  $\text{Hg}_0$

a  $\text{Hg}^{2+}$   $\text{Hg} \rightleftharpoons \text{Hg}^{2+} + 2\text{e}^-$ . Esta reacción de oxidación ocurre en presencia de microorganismos aeróbicos en el que participa la catalasa, una enzima importante en el ciclo del oxígeno. Los microorganismos aeróbicos también pueden llevar a cabo la oxidación del mercurio a partir del  $\text{HgS}$  en el sedimento, oxidando el sulfuro a sulfito y luego a sulfato. El ión mercúrico ( $\text{Hg}^{2+}$ ), sin embargo, puede ser reducido en un proceso de desintoxicación por microorganismos (por ejemplo *pseudomonas sp.*) a  $\text{Hg}^0$  en presencia de NADH (nicotinamida adenina dinucleótido reducido) que se oxida a  $\text{NAD}^+$  (nicotinamida adenina dinucleótido oxidado). El NAD es una coenzima cuya función es actuar como agente en la transferencia de átomos de hidrógeno en las reacciones de oxidación – reducción.

Un grupo de metales son necesarios para el desarrollo de las bacterias dado a que presentan parte esencial de su estructura y componentes celulares, pero en algunos casos estos metales no se encuentran disponibles en el ambiente o las concentraciones presentes en el medio no son las suficientes para el normal crecimiento, las bacterias *Pseudomonas aeruginosas*, requiere la presencia de hierro para su replicación tanto como en el organismo infectado como en el medio ambiente [14].

En la actualidad el uso de los microorganismos es implementado como biosensores, en el caso de las *Pseudomonas* que producen señales en presencia de contaminantes, como metales pesados e hidrocarburos para tratar equilibrar su sistema biológico. Los microorganismos son capaces de detectar el más mínimo cambio y la presencia de contaminantes, lo que genera un método más eficaz y con costos reducidos, que implementando métodos químicos exhaustivos [15].

Una serie de microorganismos pueden movilizar metales de lixiviados presentes en el agua a través de la quelación por metabolitos y sideroforos y la metilación, da como resultado componentes celulares del organismo, fijación dentro de la célula o la precipitación como sustancias insolubles orgánicas o inorgánicas. Estos mecanismos son muy importantes para la retención de compuestos metálicos solubles presentes en la columna de agua. Presenta como una alternativa de remover metales de la fase acuosa [16].

La solubilización microbiana de los metales de los lixiviados, productos de procesos mineros como la extracción de oro, uranio, entre estos, se encuentran últimamente usados en esta industria. Este proceso se realiza implementando microorganismos quimiolitotrofos, pertenecientes a un grupo denominado



extremophilo, gracias a su gran resistencia a las condiciones de acidez (pH 1 a 3.0) y a la presencia de metales altamente tóxicos. Existen diferentes especies de organismos capaces de realizar este proceso [17].

Una importante proporción de moléculas contaminantes, sobre todo aquellas con estructuras nuevas o con sustituyentes que se encuentran raramente en la naturaleza son catabolizados lentamente, y así se acumulan persistiendo en el ecosistema. Surge así el concepto de *biorremediación*, que consiste básicamente en estimular las capacidades degradativas de los microorganismos indígenas (bacterias y hongos) a fin de mineralizar los contaminantes o bien convertirlos en especies químicas menos tóxicas y así menos nocivas [18].

Las bacterias del género *Pseudomonas* se las define como bacilos gram negativos, casi siempre móviles por uno o varios flagelos polares, son aerobios estrictos y cuyo metabolismo sólo implementa la vía oxidativa. Son bacterias muy repartidas en la naturaleza, siendo el agua y el suelo su hábitat fundamental, de estos pasan a infectar a los demás organismos superiores.

Afecta a animales y plantas y para el hombre se los considera un microbio típico oportunista, que genera infecciones graves que en algunos casos genera mortalidad y tiene una gran resistencia a la presencia de antibióticos [19].

La bacteria *Pseudomona aeruginosa*, es una bacteria patógena oportunista que causa una septicemia severa, que a veces es letal. Infecta al tracto respiratorio, al tracto urinario, infecta quemaduras y la sangre. La mayoría de las infecciones causadas por este microorganismo son generalmente intratables, debido, a la gran resistencia de este organismo a los antibióticos [20].

Arsénico es otro de los contaminantes presentes en el agua peligrosos para la vida acuática, es un compuesto que prevalece más tiempo en el medio. Los mejores medios para eliminar estos compuestos, es mediante el uso de microorganismos que reduzcan el arsenito a arsenate, que es un compuesto pocos soluble y con menor toxicidad. Las *Pseudomonas lubricans*, presentan una mayor resistencia hacia el arsénico, con concentraciones más de 3mg/l. En la actualidad se los utiliza como proceso de remediación en zonas con efluentes contaminados por arsénico [21].

El impacto ambiental de los contaminantes metálicos en suelos y sedimentos, es estrictamente dependiente de la capacidad de interacción de éstos, con componentes del medio ambiente y su respuesta a las condiciones fisicoquímicas y biológicas de su entorno que pueden ser: Biodisponibilidad; La toxicidad de los metales pesados es muy alta. Su acción directa sobre los seres

vivos ocurre a través del bloqueo de las actividades biológicas, es decir, la inactivación enzimática por la formación de enlaces entre el metal y los grupos -SH (sulfhidrilos) de las proteínas, causando daños irreversibles en los diferentes organismos. Para que los metales pesados puedan ejercer su toxicidad sobre un ser vivo, éstos deben encontrarse disponibles para ser captados por éste, es decir, que el metal debe estar biodisponible. El concepto de bio-disponibilidad se encuentra íntimamente relacionado con las condiciones fisicoquímicas del ambiente, que determinan la especiación y por lo tanto la concentración de metal libre y lábil. Por ello es fundamental al determinar el grado de contaminación por metales pesados de un ambiente, conocer su bio-disponibilidad, es decir, la concentración de metal libre y lábil presente en la muestra.

Bio-lixiviación es un mecanismo de solubilización que es utilizado en la industria minera. Por intermedio de la acción microbiana, los metales presentes en los minerales resultan extraídos en fase acuosa. Tal es el caso de la obtención de Cu por la oxidación de las menas de  $\text{Cu}_2\text{S}$  (calcocita) a  $\text{CuSO}_4$  por intermedio de la acción de las bacterias *Thiobacillus ferroxidans* y *Thiobacillus thiooxidans*. Bio-absorción es un fenómeno ampliamente estudiado en la biorremediación de diversos metales pesados como el cadmio, cromo, plomo, níquel, zinc y cobre.

Los microorganismos utilizados como bio-absorbentes, aislados a partir de ecosistemas contaminados, retienen los metales pesados a intervalos de tiempo relativamente cortos al entrar en contacto con soluciones de dichos metales. Esto minimiza los costos en un proceso de remediación, ya que, no requiere el agregado de nutrientes al sistema, al no requerir un metabolismo microbiano activo. Los fenómenos de bio-absorción se caracterizan por la retención del metal mediante una interacción fisicoquímica del metal con ligandos pertenecientes a la superficie celular. Esta interacción se produce con grupos funcionales expuestos hacia el exterior celular, pertenecientes a partes de moléculas componentes de las paredes celulares, como por ejemplo: carboxilo, amino, hidroxilo, fosfato y sulfhidrilo.

Bio-acumulación es un mecanismo celular que involucra un sistema de transporte de membrana que internaliza al metal pesado presente en el entorno celular con gasto de energía. Este consumo energético se genera a través del sistema  $H^+$ -ATPasa. Una vez incorporado el metal pesado al citoplasma, éste es secuestrado por la presencia de proteínas ricas en grupos sulfhidrilos llamadas metalotioneínas o también puede ser compartimentalizado dentro de una vacuola, como ocurre en hongos. Algunos ejemplos de este proceso son muy interesantes, como el caso de acumulación de uranio por la bacteria

*Pseudomonas aeruginosa*, el cual fue detectado íntegramente en el citoplasma, al igual que en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Bio-mineralización es cuando los microorganismos son capaces de precipitar metales y radionuclidos como carbonatos e hidróxidos, mediante un mecanismo de resistencia codificado en plásmidos. Este mecanismo aparece por el funcionamiento de una bomba que expulsa el metal tóxico presente en el citoplasma hacia el exterior celular en contracorriente a un flujo de H<sup>+</sup> hacia el interior celular. Esto produce una alcalinización localizada sobre la superficie celular externa y por lo tanto la precipitación del metal pesado. Otra forma de precipitar los metales es a través de la formación de sulfuros o fosfatos, como resultado de alguna actividad enzimática celular. Un ejemplo de ello es la precipitación de sulfuros metálicos en reactores con cultivos mixtos de bacterias reductoras de sulfato (10, 21) o la acumulación de CdS en la pared celular de las bacterias *Klebsiella planticola* y *Pseudomonas aeruginosa*. Bio-transformación es un proceso que involucra un cambio químico sobre el metal pesado, como por ejemplo en el estado de oxidación o metilación. Esta transformación biológica de los metales pesados que resultan tóxicos mediada por enzimas microbianas puede dar como resultado compuestos poco solubles en agua o bien compuestos volátiles. El ejemplo más claro es el ciclo del Hg en

la naturaleza, donde la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* puede reducir el catión  $\text{Hg}^{2+}$  a  $\text{Hg}^0$ , y otros organismos pueden luego metilarlo dando como producto el  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  y  $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ , que son volátiles y aún más tóxicos que el propio Hg.

En la quimio-absorción mediada por microorganismos se pueden describir aquella clase de reacciones en donde los microorganismos bio-mineralizan un metal, formando un depósito primario. Este depósito primario funciona como núcleo de cristalización, con la subsecuente deposición del metal de interés, promoviendo y acelerando así el mecanismo de mineralización. Cualquiera de los mecanismos microbianos descritos remueve los metales pesados de efluentes contaminados. Los microorganismos autóctonos que sobreviven en sitios contaminados han desarrollado mecanismos de resistencia y/o tolerancia que nos son útiles a la hora de la implementación de procesos de biorremediación. En conclusión, el rol de los microorganismos es fundamental en los ciclos bio-geoquímicos de los metales y su utilización en los procesos de biorremediación de desechos sólidos y líquidos es esencial para el cuidado del medio ambiente. [22]

En la actualidad la protección ambiental representa valores millones a los \$ 280

millones con predicciones a la alza de \$640 billones para el 2010. Estos valores van aumentando cada día. Estos valores equivalen a la industria química mundial y es como si empleáramos a tres millones de personas. ¿Por qué elegir un proceso biológico para el tratamiento de metales pesados en la industria ya parece haber una gama completa de tecnologías?. Debido, a que microorganismos tienen la capacidad de adaptación a una variedad de contaminantes, tanto orgánicos como inorgánicos, es importante tener en cuenta desde el principio de que los microorganismos no pueden destruir los metales. Sin embargo, pueden la movilidad de los metales influir en el medio ambiente, mediante la modificación su composición química y / o características físicas. Procesos químicos también pueden hacer esto, pero no viven microorganismos esencialmente minutos fábricas de productos químicos capaz de generar una variedad de moléculas? La eliminación de metales de diversas corrientes acuosas utilizando procesos bio-absortiva y bio-acumulativa ha recibido importante atención.

“Con el crecimiento previsto de la environmental technology mercado, la confianza que tenemos son que la biología del campo de las soluciones de captura de una proporción cada vez mayor de la misma”. Los signos no son alentadores en la actualidad por varias razones, entre ellas: la relativa falta de

interdisciplinario de investigación, el desarrollo de medio ambiente biotecnologías se percibe tan mundano; fondos suficientes para promover la demostración de nuevas tecnologías y productos que compiten tecnología probada; conservadurismo y la tecnología. Bio-científicos, los científicos y los ingenieros tienen que trabajar más de cerca y apreciar sus fortalezas y contribuciones respectivas.

El potencial de la combinación de un proceso biológico con un proceso físico-químico adecuado probado, podría superar algunas de estas limitaciones y reservas. En general, la comunidad está preocupada por la biotecnología con el potencial de la industria farmacéutica y industrias agrícolas. Se ha previsto que estas bio-industrias nuevas podrían crecer a las empresas millones de dólares. Puede que haya pasado desapercibido que los servicios de agua tienen, en las últimas décadas, pasó sumas similares que ofrecen y mejoran las instalaciones de tratamiento de aguas residuales domésticas. No son pocos, en su caso, mejores ejemplos de la versatilidad y la capacidad de las bacterias de su utilización en el medio ambiente [23].

La naturaleza ha demostrado algunos de los mecanismos sutiles y complicados de control selectivo de la movilidad de los contaminantes metálicos en el medio



ambiente. Sin embargo, la aplicación de esta ciencia a la tecnología ha sido decepcionante. Un pequeño número de estudios de la planta piloto se han realizado para investigar el potencial de los microorganismos (principalmente bacterias), para extraer metales de los residuos líquidos, pero sólo un sistema en los últimos 15 años ha sido comercializado. Para explicar esta falta de aplicación, es importante comprender la eficacia, robustez y fiabilidad de los procesos biológicos fundamentales con los metales y su capacidad de competir con las tecnologías físico-químicas probadas. Para poder determinar cómo se encuentran conformadas las colonias bacterianas en cultivos independientes la PCR-DGGE, es utilizada para determinar la composición bacteriana y la diversidad presentes en cualquier medio. Esta técnica molecular nos permite determinar de una forma más precisa. Utilizando primers específicos para determinar los genes de una especie específica, La capacidad del DGGE nos proporciona una imagen visual directa de la diversidad bacteriana en la muestra si no que también nos permite determinar la presencia de especies dominantes dentro de la misma muestra. [24].

## **CAPITULO 3**

### **3.1 METODOLOGIA**

#### **DISEÑO EXPERIMENTAL**

Los trabajos previos realizados sobre bacteriología en el área de estudio han sido enfocados a la contaminación minera; de ahí la importancia de desarrollar o enfocar investigación ecológica relacionada con las poblaciones bacterianas existentes. En el estudio propuesto se lleva a cabo con tres muestras recogidas en el centro del río Gala. A estas muestras se les practicará una serie de pruebas microbiológicas para determinar las bacterias heterótrofas de tipo pseudomonas existentes, Por medio de cultivos en placas de agar Mc Conkey y después en agar nutritivo, continuando con la tinción de Gram, se obtendrán las cepas puras Gram negativas. Posteriormente, mediante la utilización de pruebas

bioquímicas se establecerá en forma confirmatoria la presencia de bacterias pertenecientes al género pseudomona.

### **Sistema de coordenadas**

Es de uso común para la ejecución de muestreos en un río. El eje "X" será la zona central del río; el eje "Y" se dirige a la derecha e izquierda (anchura); y el eje Z hacia debajo de la superficie (profundidad) respectivamente. (Grafico 3).

### **Métodos de Muestreo de Bacterias**

El muestreo que se realizará será tipo de estratificado, puesto que las muestras a ser tomadas serán por capas o estratos de condiciones homogéneas. Es un muestreo muy utilizado en Ecología. Estos muestreos sirven para confirmar algún tipo de distribución y caracterización de bacterias heterótrofas en el río Gala.

Para dicho efecto se realizará el siguiente procedimiento:

- Se tomaran muestras en tres puntos diferentes con la finalidad de abarcar

de manera horizontal el río (x; y; z).

- Las muestras serán tomadas en la superficie y a un metro máximo de profundidad.
- Se tomarán las muestras con la botella de Van Dorf:

#### **Características de la botella Van Dorf:**

- Botella de muestreo Van Dorf horizontal de 1 Lt.
  - Posee mecanismo de gatillo horizontal el cual es activado por un mensajero metal.
  - Los émbolos proveen un adecuado sello y previenen la mezcla de la muestra con las capas intermedias de agua durante el ascenso.
  - Los materiales no corrosivos de la botella previenen de cualquier contaminación de la muestra de agua.
  - Posee drenaje para vaciar la alícuota de muestra.
- 
- Se realizará una colección en cada una de las pleamares y en cada una de las bajamares.

Gala  $25.25\text{m}^3/\text{s}$   $465\text{Km}^2$

$Z = 4/3.75$  – pleamar

$Z = 0.35/0.20$  – bajamar:

Horario de muestreo. GRAFICO [4] y Tabla 1.

- Utilizando frascos de vidrio estériles de 250 ml de capacidad para las muestras de aguas.
- Y frascos de vidrio color ámbar estériles de 250 ml para la parte profunda (1m).
- Con esto se obtuvieron las siguientes muestras (Tabla 2).
- Después del muestreo serán conservadas en refrigeración, lo antes posible y ser analizado en un período no mayor a las siguientes ocho horas.
- A las muestras se les harán una serie de filtraciones para colectarlas, y así obtener un mayor número de bacterias para luego ser cultivadas en placas de Agar de pseudomona King A por lo que se siguió un procedimiento específico, así determinar el número de bacterias formadoras de colonias presentes en las muestras colectadas, además, de realizar algunas series de pruebas que revelen la existencia de bacterias heterótrofas metalofijadoras, a partir de esto, se cultivaran

en un caldo de cultivo a las colonias de pseudomonas para la obtención de cepas puras.

### **Método de la membrana filtrante para el análisis microbiológico del agua.**

La técnica de filtración de volúmenes conocidos que vamos a utilizar para retener el mayor número de bacterias, se realiza través de un filtro Millipore de acetato de celulosa 0,45 $\mu$ m de poro [25]. Se colocará la membrana filtrante estéril, sobre el centro del portafiltro, con la superficie cuadrículada hacia arriba.

Ensamblaremos el equipo, colocando el dispositivo de filtración. Se filtrarán 100 ml de agua a través del portafiltro y proceder a filtrar, para retener las bacterias [26]. A continuación removeremos la parte superior del portafiltro, transfiriendo la membrana a la placa de Petri que contiene el medio de cultivo. Esperar aproximadamente 20 minutos, permitiendo la adhesión de la membrana al medio. Incubaremos las placas, a las diferentes temperaturas y tiempos, posteriormente las membranas serán colocadas en las placas que contienen

agar de pseudomona King A, y se incubará a 28°C durante 24-48 horas. Las células viables depositadas sobre el filtro originarán colonias.

## CONTEO MICROBIOLÓGICO

La lectura de los cultivos se la realizará 28H a partir de la siembra, con un contador de colonias, tomando en cuenta únicamente aquellos platos donde el resultado oscilaba entre 25 a 250 unidades formadoras de colonias [29]. (UFC/ml ó UFC/g). Se aplicará según el criterio de Bonde (1977). Se caracterizará morfológicamente las colonias empleando la tinción de Gram.

- **Nota:** Si se sospecha que el agua contiene un alto número de bacterias es conveniente diluir la muestra antes de la filtración.

### Cultivo de las bacterias.

Se sabe que el límite máximo permitido de mercurio en ríos → 0.0002 mg/l

Rio gala (0.0002 x 24.14 veces mas del rango normal): 0.0048 mg/l

— — —

## **Equipos**

- Autoclave
- Cámara estéril
- Equipo de filtración (Millipore)
- pH-metro
- Balanza
- Cocineta
- Incubadora

## **Materiales**

- Membranas de filtración Millipore de 0,45 $\mu$ m.
- Bomba de vacío
- Pinzas estériles
- Muestra de colonias bacterianas
- Asa de platino
- Espátula de Drygalski
- Mechero de alcohol
- Micro-pipetas
- Cajas de petri
- Tubos de ensayo
- Conos
- Matraces
- Guantes
- Papel de empaque
- Algodón
- Alcohol potable
- Tubos de 1.5 ml



- Porta-tubos para tubos de 1.5 ml
- Porta tubos para tubos de ensayo
- Cinta adhesiva
- Probeta

### **Reactivos**

- Agar Kin de pseudomonas
- Agua destilada
- Agua destilada estéril
- Cloruro de mercurio

### **Pasos:**

Cultivaremos las 48 membranas de filtrado en cada una de las cajas petri con pseudomona agar king A. Al culminar de la incubación contaremos las colonias en sus respectivas membranas. Se expresará los resultados como unidades formadoras de colonias (u.f.c.) por 100 ml de agua, considerando el volumen filtrado y el factor de dilución. Se seleccionará las colonias de pseudomonas desde los 48 agares cultivado. Obteniendo la selección, procederemos a aislar las colonias sospechosas, especificadas en el agar selectivo, y volveremos a aislar las colonias para cultivar en al agar pseudomona king A, donde crecerán en condiciones de pH de 7 (+/-2).

Una vez aisladas las colonias realizaremos inoculaciones a un medio líquido, (cultivo puro). Se esperará las 24 horas para la incubación.

Se tomará una pequeña cantidad de la colonia y sembrando en un caja Petri que contenga medio sólido, rayándolo en forma de estrías.

Cuando esté listo el cultivo se harán diluciones del cloruro de mercurio.

En la Tabla 3 se muestran las diferentes concentraciones de cloruro de mercurio.

1'000.000ml  $\longrightarrow$  1000  $\mu$ l

1ml  $\longrightarrow$  X  $\mu$ l

0,01  $\mu$ l en 1ml de solvente = 1ppm  $\longrightarrow$  10  $\mu$ l en 1ml de solvente  
= 1000ppm

---

**Nota:** -son ocho tipos de colonias más probables encontradas. No recomendamos usar diluciones a partir de  $10^{-1}$  debido a que la concentración encontrada en el río es de  $0.0048\mu\text{l/ml}$ .

Para la preparación del agar de pseudomona, se le añade un volumen final de cada dilución ( $1000\ \mu\text{l}$ ). Obteniendo un total de 40 cajas Petri (Tabla 4)

Re procederá a realizar una nueva incubación las diferentes colonias de pseudomonas obtenidas en el paso anterior donde se la cultivo a las diferentes concentraciones de cloruro de magnesio en condiciones aeróbicas.

La incubación se realiza en una incubadora a  $28^{\circ}\text{C}$  en una estufa durante 24 horas. Luego se realizara un conteo de las UFC obtenidas en cada muestra.

Se determinara cual dilución ofreció mayor eficacia metalofijadora, según la capacidad de crecimiento de las UFC. Se seleccionan las colonias de la caja petri que obtuvo mejor rendimiento metalofijador.

Una vez realizados todos estos pasos se procede a Aplicar la metodología de la DGGE a cada una de las colonias seleccionadas.

### **METODO DE DGGE:**

Para dicho método de rastreo molecular, utilizaremos un equipo para DGGE (electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización), para analizar poblaciones microbianas basadas en amplificaciones de fragmentos de genes ribosomales (C.B.S Scientific. Co DGGE – 2001- Rev. B) Figura 6.

Siguiendo el protocolo descrito por (*G. Muyzer, E.C. de Waal and A.G. Uitterlinden. 1993.*) La utilidad de ésta diferenciación radica en donde hay mezclas de varios fragmentos de ADN con éstas características es muy común cuando se amplifican fragmentos de genes utilizando la técnica PCR. Entonces para dicho efecto, nos valdremos de un gel de poliacrilamida (6%) con gradiente químico lineal de 40 - 60% desnaturalizante (Urea-formamida). Se lo condicionará a 60°C de electroforesis 10´20 voltios/5 h 150 voltios. Gracias al gen ribosomal de la subunidad 16S, y las variaciones en éste gen definirán los grupos taxonómicos en las bacterias que se encuentran en una colonia específica de las secuencias de estos genes serán utilizadas para poder realizar

los respectivos análisis de la composición de comunidades microbianas en las muestras ambientales recogidas, o también para determinar rápidamente a que taxón pertenece una cepa bacteriana.

## **EXTRACCIÓN DEL DNA Y PURIFICACIÓN DEL DNA.**

Para obtener el DNA completo aplicaremos el método detallado por Soluciones QPCR Protocolo y Técnicas Cultek 02.2006; el mismo que utiliza CTAB – Fenol – Cloroformo para la extracción y purificación consecuente, e Isopropanol para lograr un buen precipitado. El DNA lo purificaremos gracias a la técnica puntualizada por Smit et al., 1997, durante el cual se usará un Sistema de Purificación fundamentado en filtros (Wizard<sup>®</sup> PCR Preps DNA Purification System). El Kit comercial "**Wizard genomic DNA purification kit**" [27], nos servirá para purificar material genético de las células de cultivo bacteriano. Para la realización de este y otros métodos se debe seguir las instrucciones del fabricante, (esta técnica es la que vamos a utilizar en el laboratorio para purificar DNA, y se describirá posteriormente sus pasos para la obtención de dicho material).

## **Módulo central**

Se Cultivan los microorganismos en el medio más adecuado o en 5-10mL de medio de cultivo. O si vamos a utilizar las placas de agar, recogemos las colonias con un asa estéril y suspenderlas en 5mL de buffer de suspensión (3,3mL de NaCl 3M; 1,0mL de Tris 1M pH 8,0; 2,0mL de EDTA 0,5M pH 8,0; 58,5mL de sacarosa y ajustar el volumen a 100mL). Si se utiliza medio de crecimiento, centrifugar las colonias durante 5min a 3600xg a 4°C, eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en 5mL de buffer de suspensión.

Se centrifugar la suspensión durante 5min a 3600xg a 4°C. Se eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en 3,78mL de buffer de suspensión.

Se le añade 200µL de SDS al 20% y se mezclar completamente mediante inversión. Se incuba la mezcla a 37°C durante 30min. Añadir 20µL de proteinasa K (20mg/mL), mezclar y continuar incubando a 37°C durante otro 30min. Se inocula 720µL de NaCl (5M), homogenizar la mezcla y añadir 600µL de CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) y se mezclar por inversión.

Se incubaba a 65°C durante 10min y a 37°C durante 5min. Luego se le Agrega un volumen igual de PCI (25:24:1 fenol-cloroformo-alcohol isoamílico) y se centrifugar a 1500×g durante 15min. Se Traspasar la fase acuosa superior a un nuevo tubo. Añadir un volumen igual de CI (24:1 cloroformo-alcohol isoamílico) y centrifugar durante 15min a 1500×g.

Traspasamos la fase acuosa superior a un nuevo tubo. Añadir 2,5 volúmenes de etanol frío al 95%, mezclar por inversión y mantener a -70°C durante 30min.

Centrifugamos durante 30min a 14500×g. Eliminar el sobrenadante y secar el pellet mediante vacío. Resuspender el pellet en 400µL de buffer TE (Tris HCl 10mM; EDTA 1mM pH 8,0). Añadir 1µL de una dilución 1:3 en agua estéril de RNasa T1. Incubar la mezcla a 37°C durante 1h y Centrifugar a 19900×g durante 2min.

Se traspasará la fase acuosa superior a un nuevo tubo, añadiremos 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M y mezclar bien. Precipitar el DNA con 2,5 volúmenes de etanol frío al 95%. Mantener a -70°C durante 20-30min. Centrifugar durante 8min a 19900×g. Eliminar el sobrenadante. Lavar el pellet

con 500 $\mu$ L de etanol al 70% y volver a centrifugar durante 8min. Se descartar el sobrenadante, secar el DNA a vacío (15-30min) y disolver el pellet de DNA en 100-400 $\mu$ L de agua estéril.

Después de realizar la extracción de ADN se debe medir la concentración con un espectrofotómetro: diluir una alícuota 1:20 (15 $\mu$ L en 285 $\mu$ L de H<sub>2</sub>O), y leer a  $\lambda = 260\text{nm}$ . La A<sub>260</sub> es igual a la concentración de DNA en gr/L.

### **PCR (16SrRNA) DEL DNA BACTERIANO**

La amplificación exponencial del DNA por PCR - DGGE permitirá obtener una cantidad suficiente de muestra para poder llevar a cabo los análisis subsecuentes, lo cual lo realizaremos mediante la técnica ya descrita por Schaefer et al., (2001). Las bacterias serán extraídas a partir de los cultivos líquidos en los cuales se las aisló previamente, estas cadenas de ADN serán amplificadas por PCR - DGGE usando los primers PRBA338F-GC (5'GCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') y 518R-1 (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'), complementarios de la región conservada 16S RNA, con 35 ciclos termales.



**Condiciones de la reacción de PCR para el gen 16S rRNA [27]**  
(Tabla 5).

**Condiciones para el termociclador para la reacción de PCR para el gen 16SrRNA [27]** (Tabla 6).

Las amplificaciones por PCR se realizaron con un termociclador (Bio–Rad). Para amplificar selectivamente segmentos de genes que codifican para el 16S

**Tinción:**

Para el proceso de la tinción, se empleará la tinción SYBR Green I, lo que nos permite determinar las muestras de una forma rápida. Lebaron *et al.* (2001) encuentran que las células teñidas con SYBR Green I tienen mayor fluorescencia y se obtiene mejor discriminación de la fluorescencia del fondo (ruido) en comparación con células teñidas con otros fluorocromos.

Una vez terminada la tinción, el gel será fotografiado con ayuda de una cámara digital (8 Megapíxeles; con Zoom óptico).

**Análisis de Imagen:**

Para el análisis de los fragmentos y genotipado usaremos el programa Gene Profiler y Adobe Photo Shop, para realizar un mejor análisis. El software es un paquete completo que nos ayuda a detectar la presencia de bandas en un gel, y a calibrar los tamaños e intensidad de los mismos. Mediante el uso de marcadores de calibración en cada serie de electroforesis en gel, el Gene Profiler puede calcular automáticamente el peso molecular ( $M_r$ ), punto isoeléctrico ( $pI$ ) y los valores de concentración de cualquier fragmento de ADN o banda polipeptídica detectado. Además, el módulo de software es capaz de corregir y analizar las imágenes distorsionadas de gel, asegurando el más alto grado de precisión posible.

### **Índices de Diversidad**

Empleando los **Índices de diversidad** podremos examinar la estructura de la comunidad bacteriana muestreada cuyos cálculos se resolverán con distintas formulas para establecer las poblaciones. También para empezar y dar una buena aproximación podemos utilizar la cinética de reasociación de moléculas de AND, y con ello estudiar la diversidad de las poblaciones microbianas que encontremos.

El método es sencillo y se basa en que a partir del ADN purificado al desnaturalizarse forma bandas simples. Y la tasa de reasociación de estas bandas depende del número de secuencias similares. Así, en una comunidad con muchas especies, entre mayor sea la complejidad, más lenta será la reasociación de secuencias de ADN similares. Debido a que el ADN de simple banda absorbe más fuertemente a 260nm que el de doble banda, el grado de reasociación puede medirse utilizando un espectrofotómetro (Torsvick, 1994; Paul y Clark, 1996). Se verifica la integridad del mismo después de realizar electroforesis de 5 µg de ADN en un gel de agarosa a 0.8 % (p/v) con amortiguador TAE (40 mM Tris-acetato, pH 7.6; 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA), durante 2h a 80V y teñido con SYBR Green I (0.5 mg mL<sup>-1</sup>), para luego efectuar las reacciones en cadena de la Taq ADN polimerasa.

### **Riqueza de especies (S):**

La riqueza de especies es el índice de diversidad más simple (LUDWIG Y REYNOLDS 1988) y consiste en la cantidad de especies existentes en un área determinada. La abundancia está dada por la cantidad de especies (bandas) observados en total. Este índice define el número de organismos que se

encuentran presentes en una muestra (número de bandas presentes en DGGE).

[28]

No toma en cuenta la proporción y distribución de cada especie en la comunidad, se refiere a un análisis meramente cuantitativo.

Se calcula con la siguiente ecuación:

$S = \#$  de bandas detectadas

La riqueza específica en sí, es un concepto simple de interpretar que se relaciona con el número de especies presentes en la comunidad. Entonces, puede parecer que un índice apropiado para caracterizar la riqueza de especies de una comunidad sea el 'número total de especies' ( $S$ ). Sin embargo, es prácticamente imposible enumerar todas las especies de la comunidad y, como  $S$  depende del tamaño de la muestra, es limitado como índice comparativo.

Los índices que proponemos además de ( $S$ ) para medir la riqueza de especies, de manera independiente al tamaño de la muestra, debe basarse en la relación entre  $S$  y el 'número total de individuos observados' o ( $n$ ), que se incrementa con el tamaño de la muestra.

Entre estos índices se destacan el **índice de Margalef** (1958), cuya fórmula es la siguiente:

—

### **Índice de Shannon–Weaver:**

Este índice representa a los individuos que se muestran al azar a partir de una población "indefinidamente grande", esto es, una población efectivamente infinita. La ventaja de este índice es que él lleva en consideración el número de las especies y las especies dominantes. En este caso se calcula en base a las bandas de los perfiles obtenidos del DGGE, o sea que toma en cuenta el número y la intensidad relativa de las bandas (Koizumi, 2003) [28].

Se calcula por medio de la siguiente ecuación:

Donde:

$\pi$  es la intensidad relativa de las bandas en un perfil.

### **Igualdad u homogeneidad (Evenness)**

Si todas las especies en una muestra (número de bandas presentes en DGGE)

presentan la misma abundancia (intensidad relativa de las bandas) el índice usado para medir la de equitabilidad debería ser máximo y, por lo tanto, debería decrecer tendiendo a cero a medida que las abundancias relativas se hagan menos equitativas [29]. Hurlbert (1971) destacó que todos los índices de equitabilidad mantendrían esta propiedad si son expresados como una medida que especifica que tan similar es la abundancia de las distintas especies. Su cálculo se realiza a partir del índice de riqueza de especies (S) y el índice de Shannon-Weaver (H).

Se calcula con la siguiente ecuación:

———— (Para cualquier base)

————

### **Diseño estadístico sobre los resultados arrojados por los índices de diversidad.**

La biodiversidad o diversidad biológica se define como la variabilidad de los organismos vivos de todas las fuentes, incluyendo entre otros, los organismos terrestres, marinos y de otros ecosistemas acuáticos, así como de los complejos ecológicos de los que forman parte; esto incluye diversidad dentro

de especies, entre especies y de ecosistemas (UNEP, 1992, citado por Moreno, 2001).

Para estimar estadísticamente la diversidad se debe:

1. Tener un buen conocimiento de la composición taxonómica.
2. Considerar que todos los individuos asignados a una clase (especie) son idénticos. Es decir, no se reconoce la variabilidad que puede existir entre, por ejemplo: etapas del desarrollo de la bacteria (quiste-espora –etapa vegetativa, etc).

La diversidad en una muestra bacteriana es una *variable nominal*, las categorías son las especies y por lo tanto el único valor de tendencia central que puede obtenerse es la *moda* (categoría con mayor frecuencia, en este caso la especie más abundante), siendo imposible calcular un promedio o una mediana. Sí puede medirse la *dispersión*, la *distribución* de las observaciones entre categorías que se relacionan con el concepto de diversidad.

## **CAPITULO 4**

### **4.1 ANÁLISIS DEL PROYECTO**

- 1 Analizar la importancia de este estudio y los impactos positivos, que podrían tener en las poblaciones aledañas, como al desarrollo científico del país.
- 2 Tenemos la confianza de la presencia microorganismos con capacidad metalo-fijadora, debida a que las aguas del río se encuentran contaminadas con mercurio y demás metales, gracias a la acción minera, el cual es un sustento para la población de Tenguel.



## 4.2 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

- 1 Se espera que mediante el implemento de la técnica de DGGE, para la caracterización de las bacterias, se pueda determinar la predominancia organismos Gram negativos, en especial la existencia de géneros pseudomona en el río Gala, para el uso de las mismas en futuros procesos de biorremediación.
- 2 La aislación ulterior de las bacterias, con mayor potencialidad de resistencia y fijación al mercurio, para lograr la obtención, mantenimiento y almacenamiento de cepas puras.
- 3 Utilizar las cepas puras aisladas para estudios posteriores y pruebas bioquímicas sobre su capacidad metalo-fijadora.
- 4 Se establecerá una línea base de la presencia de los microorganismos presentes en el Rio Gala y así contribuir con el desarrollo tecnológico y científico, vinculados con los procesos de remediación ambiental y tratamientos de residuos tóxicos, por parte de la industria minera.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. Mediante la caracterización bioquímica, se han implementando medios de cultivos selectivos, pruebas de resistencia y métodos de fijación de mercurio se pudo determinó bibliográficamente que los géneros pseudomonas predominaban en zonas con altas concentraciones de metales pesados.
2. Dadas las características biológicas de estos microorganismos (género Pseudomona), se asumió la existencia de las mismas en el rio Gala. Debido a que se encuentran distribuidas de manera amplia en suelos y aguas contaminadas con metales pesados.
3. Gracias a las técnicas moleculares (PCR-DGGE), se puede determinar específicamente el número y especie presentes en las muestras, y definir las especies dominantes dentro de las cepas aisladas.

## **ANEXOS**

## GRAFICOS

FIGURA 1

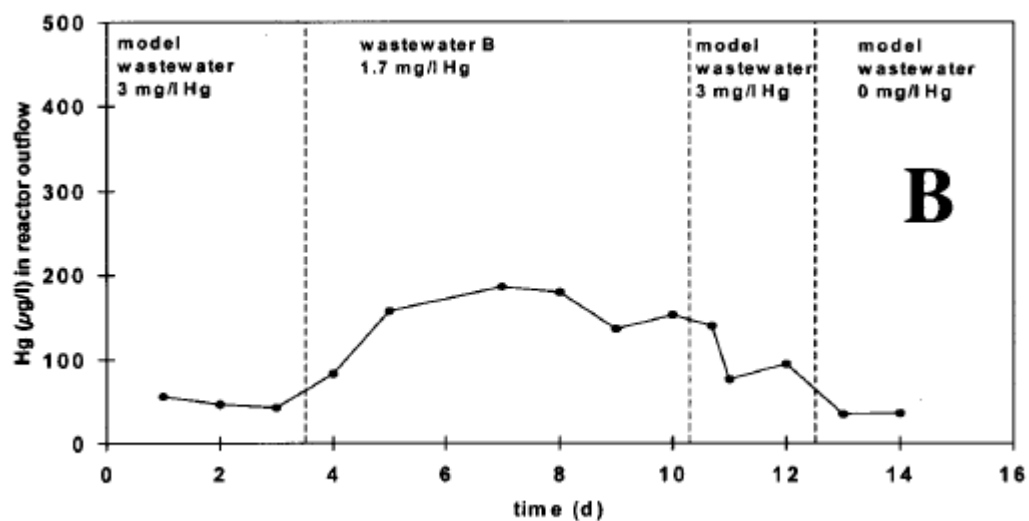


FIGURA 2

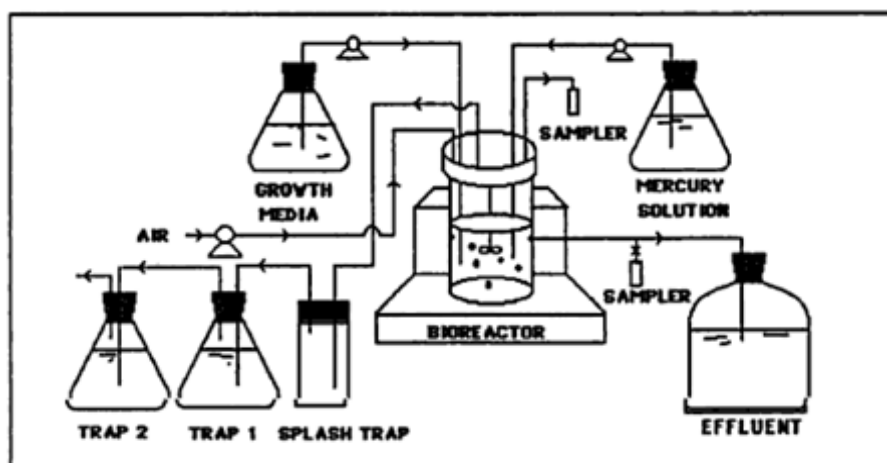


Figure 1. Schematic of biological process for removing Hg<sup>2+</sup> from aqueous solutions

FIGURA 3

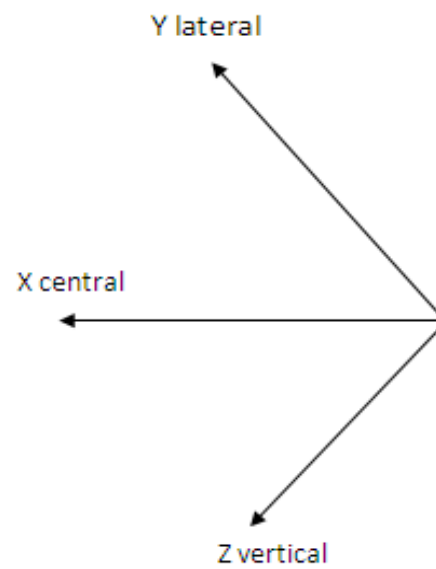


FIGURA 4. TOMA DE MUESTRAS 1

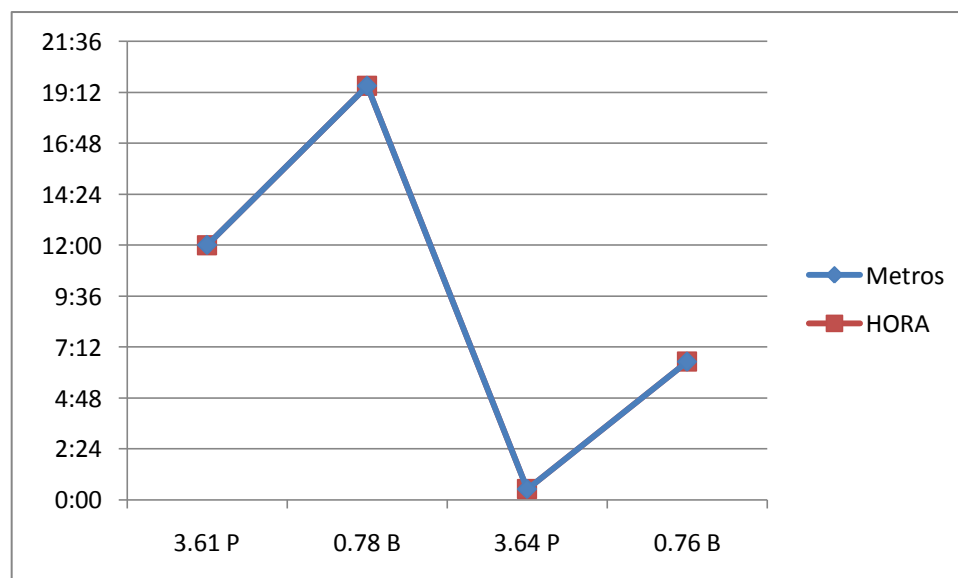
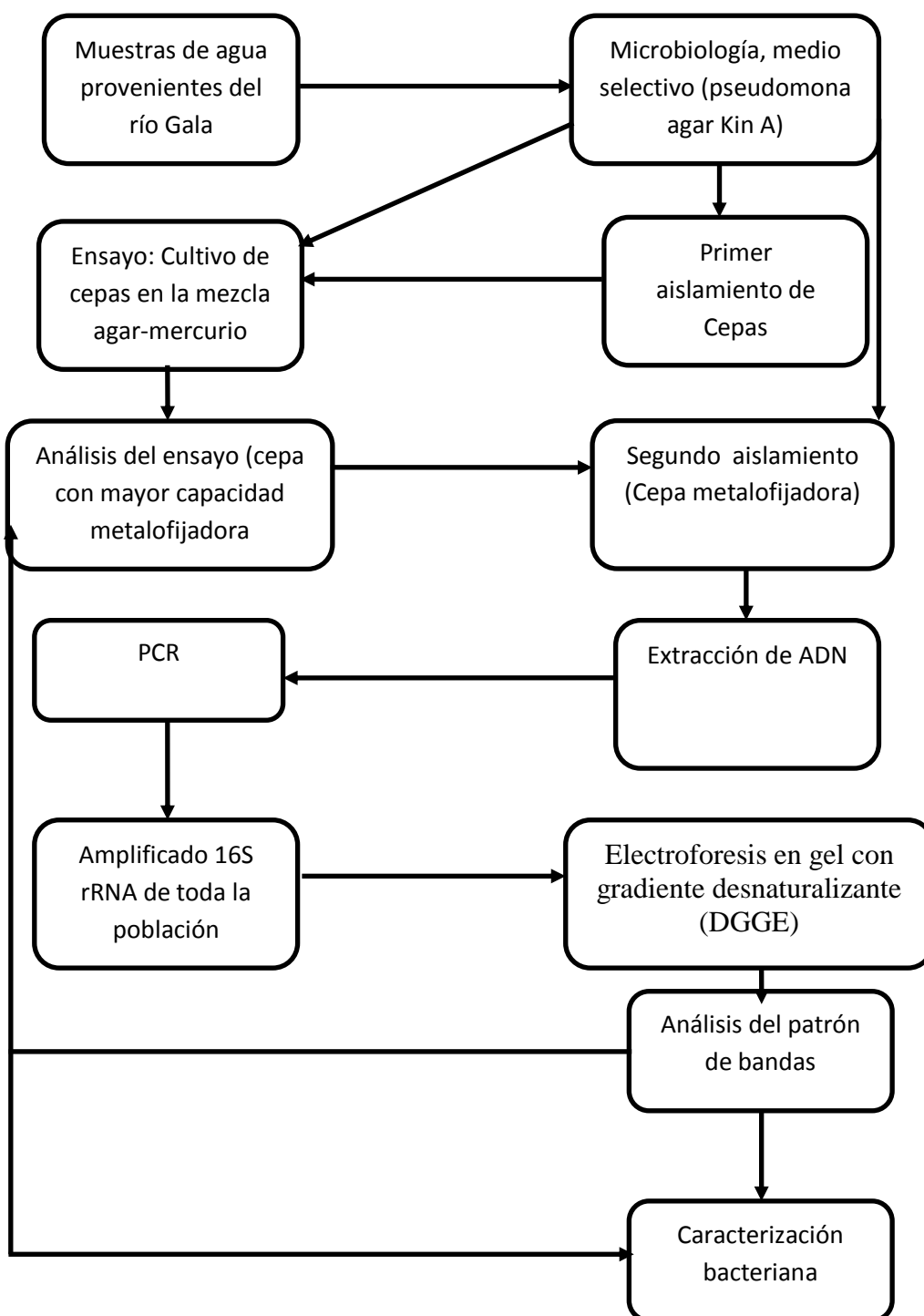
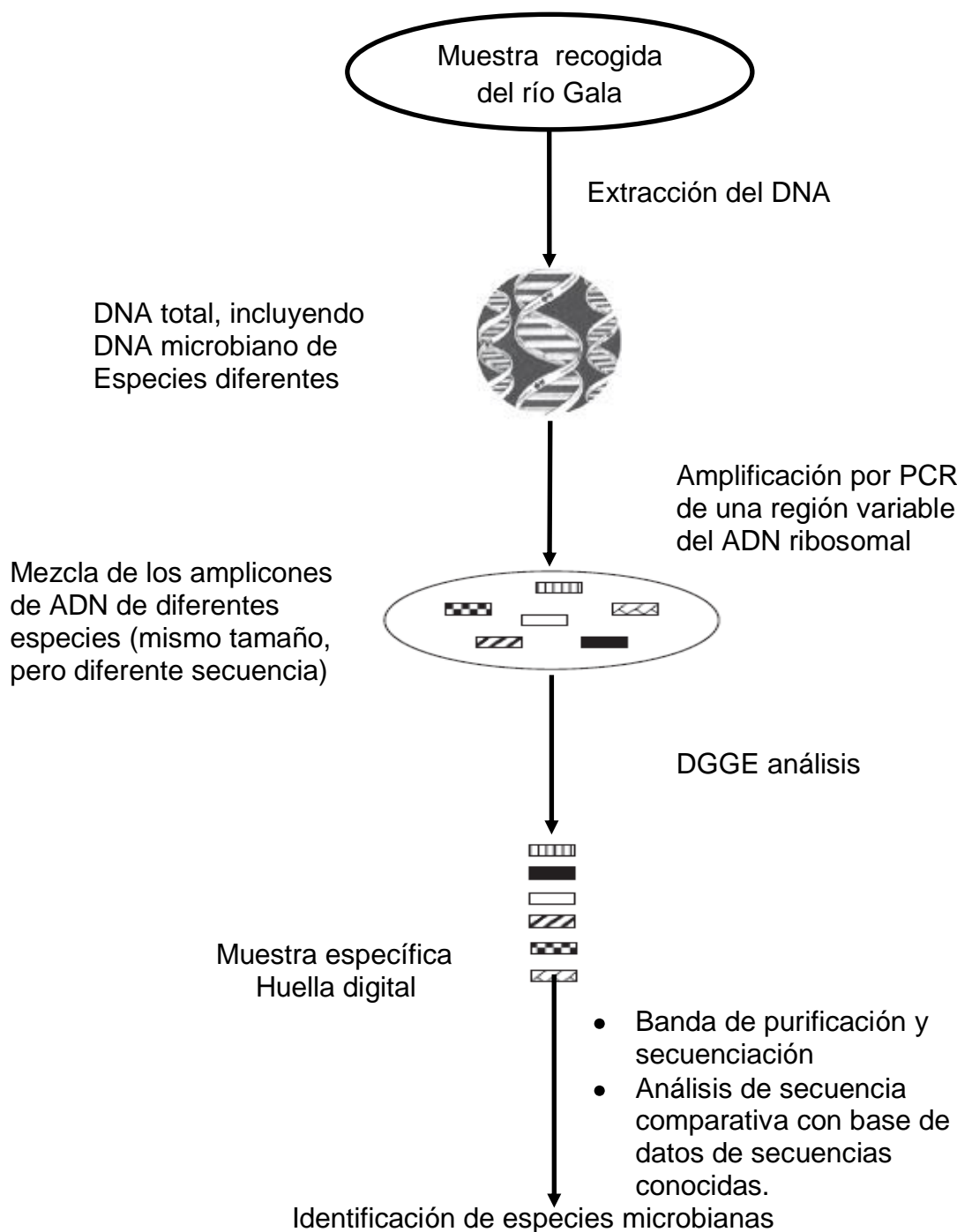


FIGURA 5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



**FIGURA 6**  
**ESTRATEGIA EXPERIMENTAL DEL METODO DGGE [36].**



**TABLAS**

TABLA 1.

Hora hh:mm	Altura Metros
00:30	3.64 P
06:30	0.76 B
12:00	3.61 P
19:30	0.78 B

TABLA 2.

Horario	Tipo de marea	# muestras Sup. y Prof	3 puntos a la horizontal	Replicas
00:30	3.64 P	2	6	12
06:30	0.76 B	2	6	12
12:00	3.61 P	2	6	12
19:30	0.78 B	2	6	12
<b>Total</b>		<b>8/punto</b>	<b>24</b>	<b>48</b>

TABLA 3.



<b>Dilución</b>	$10^0$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$
<b>Concentración</b>	10000ppm	1000ppm	100ppm	10ppm	1ppm	0.1ppm	0.01ppm
<b>Concentración real</b>			500ppm	50ppm	5ppm	0.5ppm	0.05ppm
<b>Volumen 1</b>	---	---	50µl	50µl	50µl	50µl	50µl
<b>Volumen final</b>	---	---	1000 µl	1000µl	1000 µl	1000 µl	1000 µl
<b>Total (*8c/D)</b>			<b>8000</b>	<b>8000</b>	<b>8000</b>	<b>8000</b>	<b>8000</b>

TABLA 4.

8 cajas petri	c/u $10^{-2}$
8 cajas petri	c/u $10^{-3}$
8 cajas petri	c/u $10^{-4}$
8 cajas petri	c/u $10^{-5}$
8 cajas petri	c/u $10^{-6}$
<b>Total</b>	<b>40 cajas petri</b>

TABLA 5.

Componentes de la reacción	Concentración final	25µl de reacción
<b>Metodología</b>		
Agua MQ	Variable	17.30 µl
Amortiguador 10x	1x	2.50 µl
MgCl <sub>2</sub>	1.5mM	1.50 µl
dNTP's 1	0 mM de cada dNTP	0.5 µl
Iniciador 8for	6.6 pmol/µl	1.0 µl
Iniciador 1492 rev	6.6 pmol/µl	1.0 µl
Taq polimerasa 5 U/µl	1 U/µl	0.2 µl
DNA molde	0.25 mg/reacción	1 µl

**Nota:** Componentes para una reacción de 25µl,

**TABLA 6.**

	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94°C	5 min
Desnaturalización	94°C	30 seg
Alineamiento	52°C	20 seg
Alargamiento	68°C	40 s 35 ciclos del paso 2 al 4
Alargamiento final	68°C	7 min

**TABLA 7.**

COMPONENTE	LIMITE RECOMENDABLE mg/l	LIMITE PERMISIBLE mg/l
Arsénico	-----	0,05
Bario	-----	1
Cadmio	-----	0,005
Cianuro	-----	0,1
Cromo	-----	0,05
Dureza (CaCo3)	150	500
Fluoruros	Ver tabla IV.7	
Mercurio	-----	0,001
Níquel	-----	0,05
N-Nitratos (N)	-----	10
N-Nitritos (N)	-----	0,1
Plata	-----	0,05
Plomo	-----	0,05
Selenio	-----	0,01
Sodio	20	115

## CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.

ACTIVIDADES	ENE	FEB	MAR	ABR	MAY	JUN	JUL	AGO	SEP	OCT	NOV	DIC
Toma de las muestras (aguas abajo del Rio Gala)												
Transporte y preservación de muestras.												
Cultivo de las muestras em agar selectivo												
Análisis de las colonias del género pseudomona												
Obtención de cepas puras, en medio liquido de cultivo.												
Bioensayo en Agar/Mercurio												
Análisis de los crecimientos obtenidas en los distintos cultivos agar/mercurio												
Aislamiento de la UFC con mayor actividad metalofijadora												
Caracterización por el método PCR- DGGE												
Análisis de los índices de diversidad y de resultados												
Escritura de publicación/ es de resultados												

## ANALISIS DE COSTO

<b>No.</b>	<b>ACTIVIDAD</b>	<b>FECHA INICIO</b>	<b>RECURSOS MATERIALES</b>	<b>RECURSOS HUMANOS</b>	<b>COSTO DE LA ACTIVIDAD</b>
<b>1</b>	Toma de las muestras (aguas abajo del Rio Gala)	3 días	Botellas Boeco-Germany con tapa rosca de 250 ml. Botella Van Dorf Canoa	2 técnico para toma de muestras 1 Panguero	768, <sup>60</sup>
<b>2</b>	Transporte y preservación de muestras.		Hielera Transporte: Automotor, combustible.	Chofer.	140 <sup>00</sup>
<b>3</b>	Cultivo de las muestras	1 Mes	Cajas petri Agar pseudomona King A Varios	2 Biotecnólogos	123, <sup>00</sup>
<b>4</b>	Análisis de las colonias del genero pseudomona	1 mes		2 Biotecnólogos	200, <sup>00</sup>
<b>5</b>	Obtención de cepas puras, en medio liquido de cultivo.	Enero	TSB 500g		44, <sup>00</sup>
<b>6</b>	Bioensayo en				200, <sup>00</sup>

	Agar/Mercurio				
<b>7</b>	Análisis de los crecimientos obtenidas en los distintos cultivos agar/mercurio				120, <sup>00</sup>
<b>8</b>	Aislamiento de la UFC con mayor actividad metalofijadora				-----
<b>9</b>	Caracterización por el método PCR- DGGE		-Equipo DGGE -Kit de extracción		6800, <sup>00</sup>
<b>10</b>	Análisis de los índices de diversidad		Ordenadores		1250, <sup>00</sup>
<b>11</b>	Escritura de publicación/ es de resultados		Ordenadores y material de oficina		500, <sup>00</sup>
<b>12</b>	Alquiler de laboratorio de microbiología				88000, <sup>00</sup>
<b>COSTO TOTAL P.</b>		<b>98145,<sup>60</sup></b>			

## BIBLIOGRAFIA

1. P. R. Parrish, A. C. Hendricks, J. G. Eaton, *Aquatic Toxicology*, Marking/Kimerle editors, Baltimore, April 1980, Pag. 225 – 231
2. H. von Canstein, Y. Li, K. N. Timmis, W.-D. Deckwer and I. Wagner-Dobler, *Removal of Mercury from Chloralkali Electrolysis Wastewater by a Mercury-Resistant *Pseudomonas putida* Strain*, National Center for Biotechnology (GBF), Germany, 1999, Publicación Científica
3. Conly L. Hansen y David K. Stevens, *Nutrition Biological and Physio-Chemical remediation of mercury-contaminates hazardous waste*, USA, August 2000, EPA-600-R-92-105. PP 121-125.
4. *Treatment technologies for Mercury in Soil, Waste, and Water*, U.S. environmental Protections Agency, Office of Superfund Remediation and technology Innovation, Washington DC, August 2007.
5. Chang JS, Hong J., *Estimation of kinetics of mercury detoxification from low-inoculum batch cultures of *Pseudomonas aeruginosa* PU21 (Rip64).*, Department of Chemical and Biochemical Engineering, University of California, Irvine 92717, USA, 1998, Publicación Científica
6. Osborn AM, Bruce KD, Strike P, Ritchie DA., *Distribution, diversity and evolution of the bacterial mercury resistance (mer) operon.*, School of

**Biological Sciences, Donnan Laboratories, University of Liverpool, UK.,  
1997, Publicación Científica**

7. **Valentina V. Umrana , Bioremediation of toxic heavy metals using acidothermophilic autotrophies, Department of Microbiology, MVM Sc and HSc College, Saurashtra University, Rajkot 360 002, India, 2005, Publicación Científica**
8. **LAMPREA EDWIN RIVERA, TORRES LUIS ALEJANDRO, ORTIZ LIZ LOZANO, Diseño de un biofiltro a escala de banco para la biodetoxicación de mercurio (Hg) mediante la utilización de microorganismos (*Pseudomonas aeruginosa*).**
9. **Informe del país: Ecuador, reunión regional sobre calidad de agua potable, OPS/CEPIS/REULAB, Mayo 1996, pag 3 – 7**
10. **La minería provoca una alarmante contaminación en ríos de Tenguel, 25-04-2008, [www.Ecoportal.net](http://www.Ecoportal.net)**
11. **Examen Especial Al Control De Explotación Minera En Las Cuencas De Los Ríos Santa Rosa, Caluguro, Tenguel Y Siete, A Cargo De La Dirección Regional De Minería De El Oro, Ministerio Del Ambiente Y Ministerio De Energía Y Minas, Ecuador, Pag 2-8**
12. **Resabala Carola, Inventario Nacional De Emisiones De Mercurio Y Productos Que Contienen Mercurio, ecuador, Agosto, 2008, Pag 5 /8 / 17-20**
13. **De Jaysankar, And N. Ramaiah, Characterization Of Marine Bacteria Highly Resistant To Mercury Exhibiting Multiple Resistances To Toxic Chemicals, National Institute Of Oceanography, Dona Paula, India**
14. **Visca Paolo, Colotti Gianni, Serino Laura, Daniela Verzilo, Orsi Nicola y Chiancone Emilia, Metal Regulation of Siderophore Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa* and Functional Effects of Siderophore-Metal**



**Complexes, University “La Sapienza”, Rome, Italy 1992, Publicación Científica**

15. **Pool Robert, Environmental Contamination, Biotechnology, and the Law, National Research Council, Washington, August 2000, Summary of a Forum Held at the National Academy of Sciences**
16. **Geoffrey M. Gadd., Microbial Metal Transformation, Division of Environmental and Applied Biology, Biological Sciences Institute, School of Life Sciences, University of Dundee, Dundee DD1 4HN, Scotland, UK, June 2001**
17. **A. Jerez Carlos, Biomining Microorganisms: Molecular Aspects and Applications in Biotechnology and Bioremediation, University of Chile, Santiago 2009, pag 239**
18. **Altamirano María Gabriela, AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS HIDROCARBUROLÍTICAS PROVENIENTES DE UN SUELO SOMETIDO A BIORREMEDIACIÓN, Provincia de Neuquén – Argentina, 2001**
19. **Pumarola Agustín, Microbiología y parasitología medica: Cap 43, MASSON S.A., Barcelona (España), 1987, pag 478**
20. **L. Schiller Neal, R. Monday Steven, M. Boyd Carol, T. Keen Noel and E. Ohman Dennis, Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* Alginate Lyase Gene (*algL*): Cloning, Sequencing, and Expression in *Echerichia coli*. Memphis Tennessee, 1991, Publicación Científica**
21. **Abdul Rehman, S. Awais Butt and Shahida Hasnain, Isolation and characterization of arsenite oxidizing *Pseudomonas lubricans* and its potential use in bioremediation of wastewater, Department of Microbiology and Molecular Genetics, University of the Punjab, New Campus, , Pakistan, 2010**

22. **L. Vullo Diana, MICROORGANISMOS Y METALES PESADOS: UNA INTERACCIÓN EN BENEFICIO DEL MEDIO AMBIENTE, 2003**
23. **Eccles H, Treatment of metal-contaminated wastes: why select a biological process?, BNFL, Research and Technology, Springfields, Preston, 2001**
24. **Ying Kuang, Kaori Tani, Aidan J. Synnott, Kazuhito Ohshima, Hidetoshi Higuchi, Hajime Nagahata, Yasunori Tanji, Characterization of bacterial population of raw milk from bovine mastitis by culture-independent PCR–DGGE method, *Department of Bioengineering, Tokyo Institute of Technology,, Japan Department of Bioscience, Rakuno Gakuen University, Japan 2004***
25. **Delgado Martin, Garcia Hernandez, Hormigo Felipe, Hardisson de la Torre, Álvarez Marante, Análisis Microbiológico y Fisicoquímico del agua de piscinas de la isla de Tenerife. Universidad de la Laguna,1992. Publicación Científica**
26. **Gómez Yamiris ,González González María Isabel, Chiroles Rubalcaba Sergio y García Crucet Cosset, Calidad microbiológica del agua utilizada en la Unidad de Hemodiálisis del Instituto de Nefrología, Unidad Nacional de Salud Ambiental, Ministerio de Salud Pública, Ciudad de La Habana, Cuba, 2005**
27. **López cortes Alejandro, Maya Yolanda, García Maldonado José, Diversidad filogenética de especie de *Microcoleus* de costras biológicas de suelo de la península de Baja california, Centro de Investigaciones biológicas del noroeste, Mexico, 2009.**
28. **Aguirre Garrido José Félix, Seguimiento de la comunidad bacteriana en los suelos contaminados por hidrocarburos durante su tratamiento en**

**biorreactores de fase semisólida, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa México DF, 2005.**

29. **Morales Vanegas Sarahi de los Angeles, Predicción de conteos microbiológicos en la leche cruda con base en la prueba de azul de metileno, Zamorano, Honduras, 2005.**
30. **Cedeño Ricardo, Caracterización de Comunidades Bacterianas en sistemas de engorde de camarón mediante electroforesis en geles de gradiente denaturante (DGGE), Boletín informativo No. 133, Ecuador, 2005.**
31. **CALDERON, F., RUEDA, A., MARTINEZ, M., Aislamiento e identificación de microorganismos resistentes y biorremediadores de Hg en aguas contaminadas de la bahía de Cartagena y del humedal de la conejera. Santafe de Bogotá. Tesis. Pontificia Universidad Javeriana. 1999**
32. **EHRlich, L., 1997. Biorremediation of heavy metals. USA.**
33. **Olivero, J., Arguello, E., and Johnson, B.. Human exposure to mercury in San Jorge river basin, Colombia (South America). The Science of the Total Environment., 2002, 289:41-47.**
34. **Chasar Liac, Scudder Barbarc, A. Obintewart R., Bell Aman Dah. And Georger Aiken, Mercury Cycling In Stream Ecosystems. 3. Trophic Dynamics And Methylmercury Bioaccumulation, U.S. Geological Survey, Florida Integrated Science Center, Geological Survey, National Research Program, , Boulder, Colorado, 2009, Publicación Científica**
35. **Stephenson Angela , Heavy metal analysis of liquid waste and sediment collected from the Aliaga Petrochemicals plant, Aliaga, Izmir, Turkey, Greenpeace Research Laboratory, University of Exeter, UK. September 1996.**

36. **Ercolini Danilo, PCR-DGGE fingerprint: novel strategies for detection of microbes in food, Journal of Microbiological Methods, Italy, 2003**