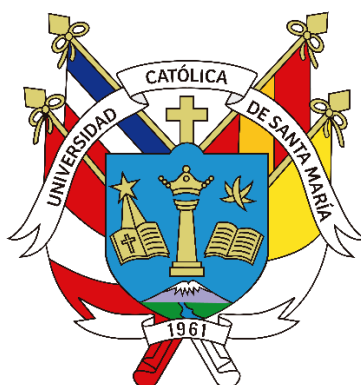


Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotechnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotechnológica



Determinación de la capacidad de *Pseudomona sp* nativa en la remoción de mercurio total de relaves de mineras informales asentadas en el Pedregal – Majes, utilizando un biorreactor de lecho fluidizado (BRLF).

Tesis presentada por el Bachiller:

Obando Zarate, Edison Manuel

ORCID: 0009-0004-1571-0432

para optar el Título Profesional de Ingeniero Biotecnólogo.

Asesor:

Mg. Roque Rodríguez, Francisco Javier

ORCID: 0000-0002-7579-834X

Arequipa- Perú
2024

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

INGENIERIA BIOTECNOLOGICA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 11 de Enero del 2024

Dictamen: 011164-C-EPIB-2024

Visto el borrador del expediente 011164, presentado por:

2004600481 - OBANDO ZARATE EDISON MANUEL

Titulado:

DETERMINACION DE LA CAPACIDAD DE PSEUDOMONA SP NATIVA EN LA REMOCION DE MERCURIO TOTAL DE RELAVES DE MINERAS INFORMALES ASENTADAS EN EL PEDREGAL - MAJES, UTILIZANDO UN BIORREACTOR DE LECHO FLUIDIZADO (BRLF).

Nuestro dictamen es:

APROBADO

Titulo Profesional/Titulo de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

INGENIERO BIOTECNOLOGO

**29230978 - ZARAVIA SANCHEZ CIFRIDO
DICTAMINADOR**



**29440909 - MOLINA RODRIGUEZ FREDY NICOLAS
DICTAMINADOR**



**41404327 - BARREDA DEL CARPIO JAIME ERNESTO
DICTAMINADOR**



Determinación de la capacidad de Pseudomona sp nativa en la remoción de mercurio total de relaves de mineras informales asentadas en el Pedregal – Majes, utilizando un biorreactor de lecho fluidizado

INFORME DE ORIGINALIDAD

12%

INDICE DE SIMILITUD

14%

FUENTES DE INTERNET

1%

PUBLICACIONES

5%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1 vdocuments.mx Fuente de Internet 2%

2 ri.uaq.mx Fuente de Internet 2%

3 www.yumpu.com Fuente de Internet 1%

4 tesis.ipn.mx Fuente de Internet 1%

5 repositorio.unprg.edu.pe Fuente de Internet 1%

6 elbuho.pe Fuente de Internet 1%

7 www.sherpachristain.org.np Fuente de Internet 1%

8 repositorio.unsa.edu.pe Fuente de Internet 1%

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo de investigación a mis padres Edwin Obando y Sonia Zárate, por su apoyo incondicional en toda mi etapa formativa, a mi abuela Andrea y mi hermana Angela; también a mi esposa Claudie y mi hija Avril, por ser el motivo para poder culminar este trabajo satisfactoriamente.



AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradecer a Dios por permitirme culminar esta etapa de formación educativa, a todos mis docentes universitarios por sus enseñanzas en especial a mi asesor Ing. Javier Roque; así mismo, agradecer a todos mis compañeros de estudio, personal de laboratorio, que me ayudaron en la realización de este trabajo de investigación.

Un agradecimiento especial al Dr. Julio César Bernabé y al Dr. Badhín Gómez, por sus enseñanzas valiosas para la culminación de este trabajo.



RESUMEN

La utilización de especies bacterianas para la descontaminación de mercurio, se viene estudiando desde muchos años atrás, ya que es un problema ambiental y social que preocupa; ya que, este metal provoca efectos tóxicos y dañinos a los seres vivos, y están realizando esfuerzos para reducir la utilización de mercurio en las distintas industrias y especialmente en los países para poder regular el uso de este metal en la minería.

En el presente trabajo de investigación a partir de los relaves de una minera informal que está asentada en la localidad de El Pedregal en la provincia de Caylloma, departamento de Arequipa, se aisló una especie bacteriana en medios de cultivo específicos como Cetrimide y King B, fue identificada bioquímicamente utilizando pruebas Coloración Gram, Catalasa, TSI, LIA, Urea y Citrato de Simmons, los resultados nos confirmaron que se trata de una bacteria del género *Pseudomona*.

Se analizó la cinética de crecimiento microbiano hallándose un tiempo de duplicación de 7.06 horas, y se comparó con un modelo de tipo logístico, el cual podemos predecir el número de bacterias por mililitro en una hora determinada, posteriormente se adaptó la bacteria aislada a distintas concentraciones de mercurio (1, 3, 5,7, 10 y 15ppm Hg), preparadas a partir de una solución stock de Nitrato de mercurio, en medio King B y un pH de 7 constante y 72 horas de experimentación, se encontró que a medida que aumenta la concentración de Mercurio en el medio de cultivo disminuye el crecimiento de la bacteria presentándose curvas de crecimiento de pequeñas a mayor concentración del metal, esto se ve reflejado en el tiempo de duplicación bacteriana que es de 8.19, 9.69,10.54, 13.09, 13.61 y 11.12 horas respectivamente.

Se realizó una comparación entre dos medios (un medio sintético y el relave) usando como equipo un BRLF que contiene a las bacterias aisladas (*Pseudomona*) atrapadas en geles de alginato de calcio, se realizó pruebas para una solución sintética con 5ppm de mercurio total y usando relave traído de la minera informal, cada prueba se realizó con los siguientes parámetros: pH 7, 37°C y 72 horas de ensayo. El primer ensayo se determinó mediante un análisis de Prueba T entre la muestra inicial conteniendo 5ppm mercurio total en la solución y la muestra después de ser procesada con las *Pseudomonas* atrapadas en alginato, que el valor T fue de 12.3059 y el T crítico fue de 2.7764, el valor P fue de 0.0003, nos indica que existe una diferencia significativa en la remoción de mercurio total en la solución, el ensayo en blanco

(geles de alginato de calcio sin *Pseudomona*), resultó no tener una diferencia significativa en la remoción de mercurio total .

Este mismo ensayo se realizó usando relave minero, después de realizar una prueba T, los datos fueron, valor T fue de 8.9378 y el T crítico fue de 2.7764, el valor P fue de 0.0009, el cual también nos muestra una diferencia significativa en la remoción de mercurio total en el relave, la prueba en blanco, también arrojó que presenta una diferencia significativa para la remoción de mercurio total en el relave.

Después de realizar las experimentaciones, se identificó molecularmente la bacteria aislada para determinar si es nueva bacteria y conocer exactamente la especie de la bacteria aislada, ésta después analizada por programas bioestadísticos se determinó que tiene un 100% de similitud con una *Pseudomona mendocina strain PC6 16S*. Esta bacteria fue aislada y estudiada en Estonia, a partir de ríos contaminados con efluentes de fenol y p-cresol, posteriormente catalogada en el GenBank.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la aplicación de un BRLF conteniendo Bacteria de *Pseudomonas sp.* atrapadas en perlas de alginato de calcio reduce significativamente la concentración de Hg total en la muestra recirculante, confirmando parcialmente la hipótesis inicial, pero no llega a depurar completamente dicha concentración hasta llegar a los parámetros permitidos por la legislación peruana.

Palabras claves: Mercurio, *Pseudomona mendocina strain PC6 16S*, BRLF.

ABSTRACT

The use of bacterial species for the decontamination of mercury, has been studied since many years ago, since it is an environmental and social problem that worries; Since this metal causes toxic and harmful effects to living beings and are making efforts to reduce the use of mercury in different industries and especially in the countries to regulate the use of this metal in mining.

In the present work of investigation from the tailings of an informal mining that is settled in the locality of El Pedregal in the province of Caylloma, department of Arequipa, a bacterial species was isolated in specific culture media like Cetrimide and King B, it was identified biochemically using Gram coloration, catalase, TSI, LIA, urea and citrate Simmons, test results confirmed to us that this is a bacterium of the genus *Pseudomonas*.

Microbial growth kinetics were analyzed, with a doubling time of 7.06 hours, and compared to a logistic type model, which can predict the number of bacteria per milliliter at a given time (this model was applied in EXCEL MS 2016), The isolated bacteria were subsequently adapted to different concentrations of mercury (1, 3, 5,7, 10 and 15ppm Hg), prepared from a stock of mercury nitrate, in King B medium and a pH of 7 constant and 72 Hours of experimentation, it was found that as the concentration of Mercury in the culture medium increases, the growth of the bacterium decreases, with smaller growth curves at higher concentration of the metal, this is reflected in the time of bacterial duplication that is of 8.19, 9.69,10.54, 13.09, 13.61 and 11.12 hours respectively.

A comparison between two media (a synthetic medium and tailings) using as equipment a fluidized bed bioreactor containing the isolated bacteria (*Pseudomonas*) entrapped in alginate gels calcium, testing was performed for a synthetic solution 5ppm performed Total mercury and using tailings brought from the informal mine, each test was performed with the following parameters: pH 7, 37 ° C and 72 hours of test. The first assay was determined by analyzing test T between the initial sample containing 5ppm total mercury in the solution and the sample after processing with *Pseudomonas* trapped in alginate, the T value was 12.3059 and T critical was 2.7764, The P value was 0.0003, this indicates that there is a significant difference in the removal of total mercury in the solution, the blank test (calcium alginate gels without Pseudomone), resulted not to have a significant difference in the removal of Total mercury.

This same test was performed using mining tail, after explaining a T test, the data were, T value was 8.9378 and the critical T was 2.7764, the P value was 0.0009, which also shows us a significant difference in the Removal of total mercury In the relave, the blank test also also showed a significant difference for the removal of total mercury In the tailings.

After conducting the experiments and finding that there is a statistically significant difference in the removal of mercury in the samples, the isolated bacteria were identified molecularly to determine if new bacteria know exactly the species of the isolated bacteria, this bacterium then analyzed by biostatistics programs has determined that 100% similarity with *Pseudomona mendocina strain PC6 16S*. This bacterium was isolated and studied in Estonia, from rivers contaminated with effluents of phenol and p-cresol, later cataloged in GenBank.

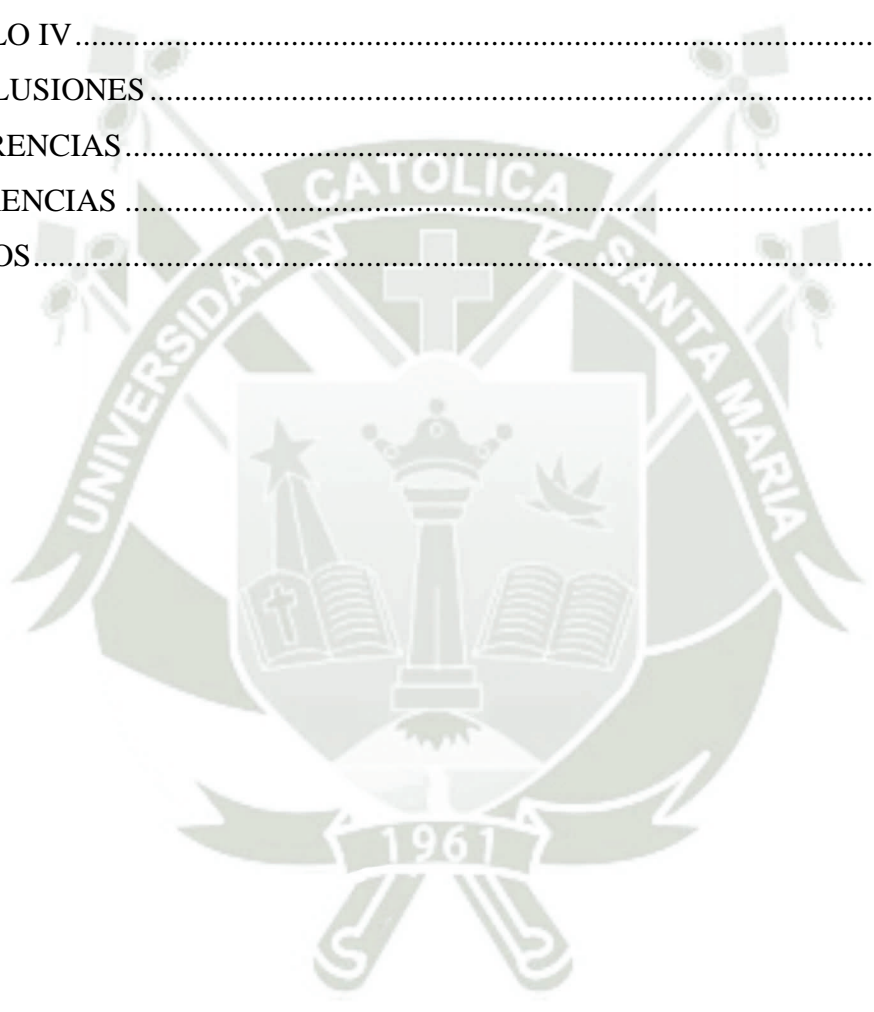
The results obtained in this study demonstrate that the application of a BRLF containing *Pseudomonas sp.* bacteria trapped in calcium alginate beads significantly reduces the concentration of total Hg in the recirculating sample, partially confirming the initial hypothesis, but does not completely purify said concentration to reach the parameters permitted by Peruvian legislation.

Keywords: Mercury, *Pseudomona mendocina strain PC6 16S*, fluidized bed bioreactor.

CONTENIDO

RESUMEN	5
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABLAS	13
INTRODUCCION.....	1
HIPOTESIS.....	3
OBJETIVOS	4
VARIABLES E INDICADORES	5
CAPITULO I.....	6
MARCO TEORICO.....	6
1.1. MERCURIO	7
1.2. SITUACIÓN DEL MERCURIO EN EL PERÚ Y MINERÍA INFORMAL.....	20
1.3. METODOS FISICOQUIMICOS DE REMOCION DE Hg.....	23
1.4. METODOS BIOLOGICOS DE REMOCION DE Hg.....	25
1.5. DIAGRAMAS DE POURBAIX.....	33
1.6. BACTERIAS	35
1.7. CINETICA MICROBIANA	38
1.8. IDENTIFICACIÓN BACTERIANA.....	43
1.9. IDENTIFICACION BACTERIA MEDIANTE BIOINFORMATICA	51
1.10. TECNICAS DE INMOVILIZACION CELULAR.....	54
1.11. BIORREACTORES	59
CAPITULO II	64
MATERIALES Y METODOS.....	64
2.1. LUGAR DE EXPERIMENTACIONES	64
2.2. MATERIALES	64
2.3. METODOLOGÍA	67
CAPITULO III.....	82
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	82
3.1. Toma de muestras.....	82
3.2. Aislamiento de microorganismos nativos presentes en las muestras.....	83
3.3. Aislamiento de <i>Pseudomonas</i>	84
3.4. Identificación morfológica y bioquímica de la Bacteria aislada.....	85

3.5. Caracterización molecular y análisis filogenético de la <i>Pseudomona</i> aislada a partir de relave minero.	88
3.6. Determinación de la cinética de crecimiento de <i>Pseudomona</i> aislada.	91
3.7. Determinación de la cinética de crecimiento de <i>Pseudomona</i> aislada en laboratorio en concentraciones distintas de mercurio.	94
3.8. Determinación de la capacidad de remoción de mercurio total, usando la cepa aislada <i>Pseudomona</i> mediante un BRLF.	98
CAPITULO IV	106
CONCLUSIONES	106
SUGERENCIAS	108
REFERENCIAS	109
ANEXOS	117



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mercurio elemental a temperatura de ambiente.	8
Figura 2. Ciclo biogeoquímico del mercurio ¹⁴	12
Figura 3. Molécula de Timerosal o Mertiolate.....	15
Figura 4. Fotografías de los efectos de la enfermedad de Minamata, presentes en el Museo de la Enfermedad de Minamata en Japón ¹⁸	17
Figura 5. Asentamientos humanos en el distrito de El Pedregal, donde se ubican loas chancadoras de mineral informales.	22
Figura 6. Organización general de un operón mer de amplio espectro en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Las flechas indican el sentido de transcripción ⁴⁵	29
Figura 7. “Mecanismo de acción de las enzimas Mer en presencia de Hg” ²	30
Figura 8. Diagrama de Pourbaix para mercurio, según software FACTSAGE 5.2, usando base de datos FACT ⁵²	34
Figura 9. Pseudomona sp, vista a microscopio óptico (www.biologia.laguia2000.com)....	35
Figura 10. Taxonomía del género Pseudomona ⁵⁶	36
Figura 11. Modelo de curva de crecimiento microbiano ⁶²	39
Figura 12. Cuadrícula de cámara de Neubauer ⁶³	41
Figura 13. Diferentes tipos bloques que forman los monómeros del, ácido algínico. (Fuente: INIVIT).....	58
Figura 14. Modelo caja de Huevos para dar explicación a las propiedades gelificantes de los alginatos al reaccionar con sales cálcicas. (Fuente: INIVIT).	59
Figura 15. Esquema general de un biorreactor tipo lecho fluidizado.....	62
Figura 16. Esquema del BRLF que se usó para las experimentaciones.	78
Figura 17. BRLF usado para las experimentaciones.....	79
Figura 18. Diagrama del proceso experimental de remoción de mercurio usando BRLF. .	80
Figura 19. Recolección de muestra de los relaves de las chancadoras.....	82
Figura 20. Muestra de relave sedimentada en el frasco de recolección.	83
Figura 21. Crecimiento de bacterias en agar nutritivo.....	84
Figura 22. Emisión de fluorescencia de Pseudomona sp. bajo luz UV a 254nm, cultivado en agar cetrimide.....	84
Figura 23. Tinción de Gram del cultivo aislado en agar cetrimide, en aumento de 100X. .	85
Figura 24. Prueba catalasa, para el cultivo de Pseudomona	85
Figura 25. Fotografía donde se muestra el resultado de la reacción en agar TSI tras ser inoculado con la cepa aislada.....	86

Figura 26. Fotografía donde se muestra el resultado de la reacción en agar LIA tras ser inoculado con la cepa aislada.....	86
Figura 27. Fotografía donde se muestra el resultado de la reacción en agar citrato simmons tras ser inoculado con la cepa aislada.....	87
Figura 28. Fotografía donde se muestra el resultado de la reacción en agar urea tras ser inoculado con cepa aislada.....	87
Figura 29. Extracción de rRNA 16S de la muestra aislada.....	88
Figura 30. Fotografía de la corrida electroforética donde se confirma la integridad del rRNA 16S de nuestra muestra (10) para la posterior y adecuada secuenciación.....	88
Figura 31. Árbol filogenético de la muestra bacteriana aislada.....	90
Figura 32. Galería fotográfica del conteo celular en cámara de Neubauer.....	91
Figura 33. Curva de crecimiento bacteriano en cultivo de Pseudomona sp.....	92
Figura 34. Normalización de la fase exponencial de la curva de crecimiento bacteriano en cultivo de Pseudomonas sp.....	92
Figura 35. Modelamiento del crecimiento bacteriano según el modelo logístico.....	93
Figura 36. Curvas de crecimiento de cultivo de Pseudomona en diferentes concentraciones de Hg en medio King B.....	94
Figura 37. Control del pH en las distintas concentraciones de mercurio con cultivo de Pseudomona.....	95
Figura 38. Gráfico del tiempo de duplicación de la bacteria en distintas concentraciones de mercurio.....	96
Figura 39. Cinética de crecimiento de cultivo de Pseudomona en diferentes concentraciones de Hg en medio King B, según el modelo logístico aplicado.....	97
Figura 40. Galería fotográfica de la configuración experimental del lecho fluidizado.....	98
Figura 41. Gráfico comparativo de la concentración de Hg usando Pseudomonas atrapadas en alginato y solo con alginato en solución sintética.....	100
Figura 42. Comparativo de la concentración de Hg en relave usando alginato vs Pseudomonas atrapadas en alginato.....	103

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Cuadro de operacionalización de variables.	5
Tabla 2. Propiedades físico-químicas del mercurio elemental.	7
Tabla 3. Diferentes microorganismos implicados en la remoción de Hg y compuestos derivados ⁴⁵	32
Tabla 4. Microorganismos inmovilizados por atrapamiento ⁸⁴	57
Tabla 5. Concentraciones de Hg para analizar cinética microbiana.	76
Tabla 6. Tiempo de Duplicación bacteriana de Pseudomonas.	96
Tabla 7. Valores de los parámetros del modelo logístico aplicado al crecimiento de Pseudomona.	97
Tabla 8. Resultado de las concentraciones de Mercurio total en la experimentación con solución sintética de 5ppm de Hg.	99
Tabla 9. Tabla ANOVA con los datos experimentales realizados con solución preparada de Nitrato de Mercurio.	99
Tabla 10. Pruebas F y T para los análisis en solución sintética de 5ppm de Hg.	101
Tabla 11. Resultado de las concentraciones de Mercurio total en la experimentación con relave.	102
Tabla 12. Tabla ANOVA con los datos experimentales realizados con muestra de relave.	103
Tabla 13. Pruebas F y T para los análisis en muestra de relave.	104

INTRODUCCION

Actualmente uno de los problemas que nos aqueja a nivel mundial es la contaminación ambiental, dentro de ello la contaminación por uso de mercurio en minería informal es un problema que se presenta en muchos países y el Perú no es la excepción y especialmente en la amazonia se presenta el mayor porcentaje de problemas ambientales relacionados a la extracción de oro utilizando mercurio para la formación de amalgamas y así poder extraer fácilmente el mineral aurífero. En Arequipa encontramos varias zonas establecidas en la extracción de oro de manera informal, donde el mercurio procede de manera irregular.

El mercurio, un metal que se presenta en forma líquida a temperatura ambiente, se presenta en distintos estados en el ambiente, de ellas las formas orgánicas son las más tóxicas para los seres vivos, como por ejemplo etilmercurio y metil mercurio, ya que provocan daños al sistema nervioso central¹. Las personas que trabajan en estas mineras informales están expuestas al contacto del mercurio (ya que lo utilizan indiscriminadamente) ya que este es aspirado bajo la forma de vapor y depositado en los pulmones, además del contacto directo con la piel, provocando serios daños a su salud a un corto o mediano plazo.

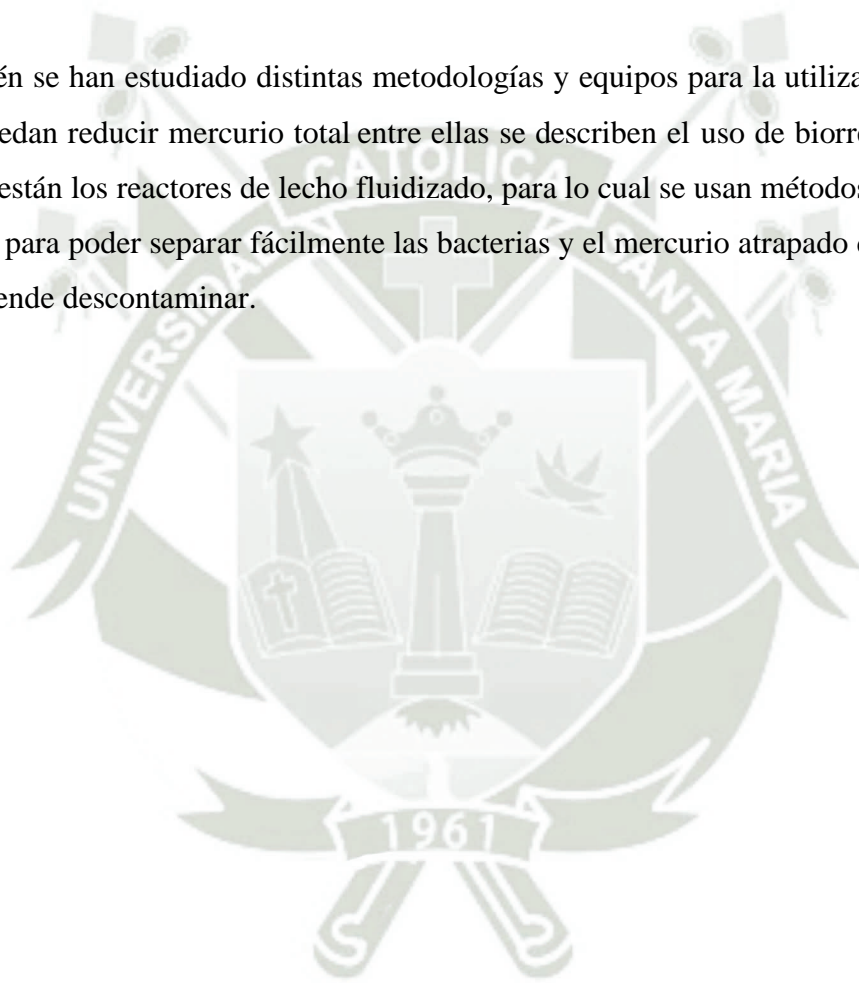
Conjuntamente, por la exposición del mercurio al medio ambiente, ya que este es quemado después de haber formado las amalgamas para atrapar el oro, y tiene impacto directo en zonas aledañas al lugar de trabajo, como familias que viven cerca de los molinos, poblaciones y/o asentamientos humanos y con mayor impacto en posibles vertimientos de ríos o agua subterránea que trasladan el metal pesado a otros lugares incrementando el área de contaminación.

Es por ello que se han realizado muchas investigaciones y trabajos para poder reducir y/o mitigar los efectos del impacto del mercurio, que incluyen métodos fisicoquímicos y biológicos, justamente estos últimos métodos son los que van cobrando mayor importancia, ya que se emplean organismos vivos para poder descomponer los compuestos más tóxicos del mercurio y/o bioacumular este metal con la finalidad de poder recuperarlo y así poder disminuir el efecto de la contaminación de este metal pesado. Se está aplicando la biotecnología para realizar mejoramiento genético a ciertas especies vegetales y bacterianas

para aumentar la capacidad de tolerar altas concentraciones de mercurio y así poder reducir su capacidad toxica².

Se han descrito distintas especies bacterianas que pueden tolerar la presencia de mercurio, entre ellas el género *Pseudomona*, que se evidencio que contiene genes que confieren capacidad para poder reducir mercurio (II), es por ello que es considerara una bacteria con alto potencial biotecnológico para la disminución del mercurio a formas menos tóxicas³.

También se han estudiado distintas metodologías y equipos para la utilización de bacterias que puedan reducir mercurio total entre ellas se describen el uso de biorreactores entre los cuales están los reactores de lecho fluidizado, para lo cual se usan métodos de atrapamiento celular para poder separar fácilmente las bacterias y el mercurio atrapado de la muestra que se pretende descontaminar.



HIPOTESIS

Debido a que los relaves mineros auríferos generados por asentamiento mineros artesanales se encuentran altamente contaminados con mercurio total, es que, cepas bacterianas de *Pseudomonas spp* aisladas y adaptadas de estas fuentes, inmovilizadas en soportes de alginato de calcio en bioreactores de lechos fluidizados, pueden trabajar eficientemente depurando total y/o parcialmente este metal pesado hasta conseguir concentraciones por debajo de los LMP estandarizados.



OBJETIVOS

○ GENERAL

- Determinar la capacidad de *Pseudomona sp* nativa en la remoción de mercurio total de relaves de mineras informales asentadas en el Pedregal – Majes, utilizando un biorreactor de lecho fluidizado (BRLF).

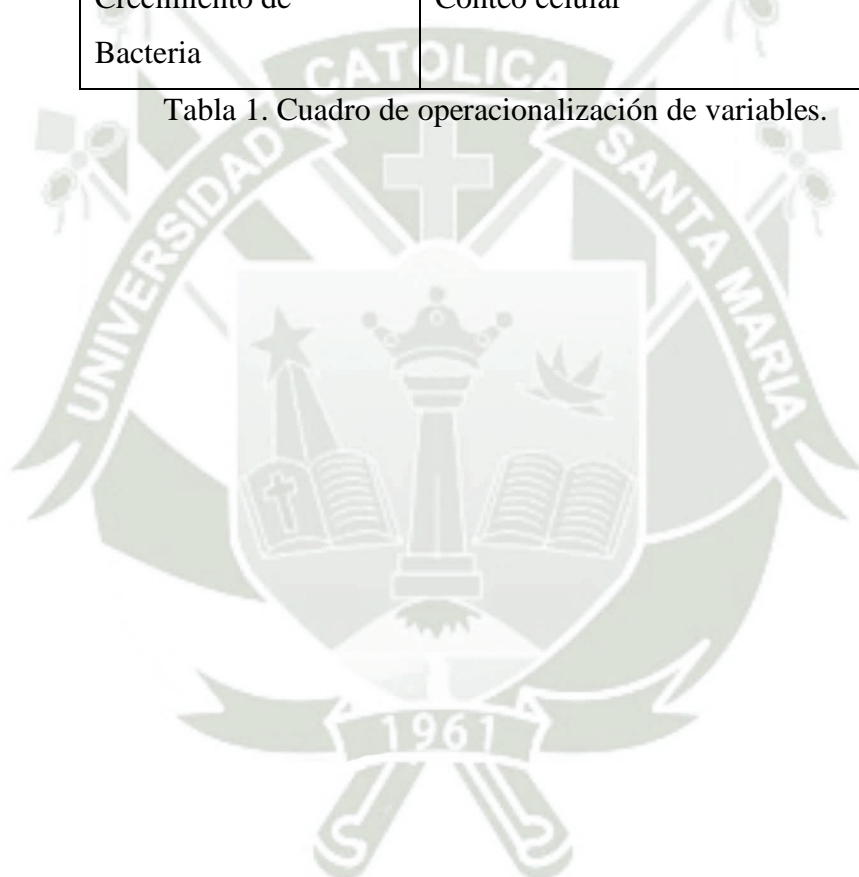
○ ESPECÍFICOS

1. Aislar e identificar bioquímicamente y molecularmente una especie de *Pseudomona* nativa obtenida a partir de relave minero aurífero.
2. Determinar los parámetros cinéticos de crecimiento de la cepa bacteriana aislada en contacto con seis diferentes concentraciones de mercurio evaluando su inhibición a su capacidad de remoción del metal pesado en fase líquida y construir el modelo logístico más adecuado al comportamiento en el relave minero aurífero analizado en este estudio.
3. Configurar experimentalmente un bioreactor de lecho fluidizado (BRLF) con células inmovilizadas en alginato de Calcio de la especie bacteriana aislada e identificada, para la remoción de Mercurio del relave minero obtenido del sector de El Pedregal.
4. Determinar la factibilidad operativa del sistema bioreaccionante utilizado para la remoción de Mercurio en fase líquida a una concentración mayor a la de la muestra utilizada en este estudio.

VARIABLES E INDICADORES

Variables independientes	
Variable	Indicador
Concentración de Mercurio	Partes por millón, ppm
Variables dependientes	
Variable	Indicador
Crecimiento de Bacteria	Conteo celular

Tabla 1. Cuadro de operacionalización de variables.



CAPITULO I

MARCO TEORICO

Actualmente, en el planeta existen bastantes problemas de contaminación ambiental localizados en todos los niveles, como: agua, suelo y aire por consecuencia del desarrollo industrial, tanto en plantas cementeras, petroquímicas, hidroeléctricas, refinerías, etc., además de actividades agrícolas, humanas y en todas en las que generen una serie de contaminantes a gran escala con metales pesados (Cu, Zn, Pb, Cd, Cr, Ni, Hg, Co, Ag, Au), alterando las condiciones normales de los sistemas biológicos, provocando cambios mayormente atmosféricos y llegando en unos casos a ser problemas con consecuencias totalmente irreversibles.

Según el EPA, la "contaminación ambiental" significa contaminación debido a la descarga (en cualquier medio medioambiental) o 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 mediante tratamientos de remediación como son los métodos físicos, químicos y biológicos⁴.

Para el caso especial de los suelos, estos metales suelen afectar la fertilidad y/o el uso posterior de los mismos; mientras que, en el caso de los acuíferos y aguas superficiales, pueden comprometer seriamente el uso de este recurso como fuente de agua para el consumo humano.

La remediación de estos ambientes contaminados mediante la utilización de métodos químicos involucra procesos de costos excesivamente altos debido a la especificidad que requieren. Este tipo de soluciones, no es aplicable en procesos de remediación in situ, ya que es imposible tratar un metal determinado debido a la competencia existente por la existencia de otros metales. La efectividad de la aplicación de métodos de remediación depende del conocimiento de los factores hidrológicos y geológicos del sitio, la solubilidad y especiación de los metales pesados, los procesos de atenuación e inmovilización y la medida en que los metales puedan dispersarse tanto horizontal como verticalmente a medida que migran por el suelo⁵.

El uso de métodos biológicos para remediar ambientes contaminados por metales pesados a lo que se suele llamar bioremediación, ofrece una mejor alternativa ya que ofrece una mayor flexibilidad operacional por su alta especificidad en la remoción del metal en estudio.

1.1.MERCURIO

El mercurio es un elemento químico de la tabla periódica, cuyo símbolo Hg, número atómico 80 y peso atómico 200.59, es un líquido blanco plateado a temperatura ambiente, figura 1 (punto de fusión -38.4°C o -37.46F); ebulle a 356.58°C (675.05F) a presión atmosférica, tabla 2. Es un metal en transición, soluble únicamente en soluciones oxidantes. Es considerado el tercer elemento más tóxico del planeta⁶. El mercurio forma soluciones llamadas amalgamas con algunos metales (por ejemplo, oro, plata, platino, uranio, cobre, plomo, sodio y potasio). A temperatura y presión ambientales se haya mayormente en su forma elemental en la atmosfera como vapor⁷.

Tabla 2. Propiedades físico-químicas del mercurio elemental.

Numero atómico	80
Solidifica	-38.87°C
Dureza	2 y 2.5 Ohms
Masa Atómica	200.59 uma
Punto de Fusión	234.28K (-39°C)
Punto de Ebullición	629.73K (365.95°C)
Densidad	13546 Kg/m ³ (13.59g/cm ²)
Potencial Normal de Reducción	+0.85 V Hg ²⁺ Hg
Conductividad Térmica	8.3 J/m s °C
Conductividad Eléctrica	10.2 (mOhm.cm) ⁻¹
Calor Específico	137.94 J/kg °K
Calor de Fusión	2.3 kJ/mol
Calor de Vaporización	59.0 kJ/mol
Calor de Atomización	61.0 kJ/mol de átomos
Estados de Oxidación	+1, +2
Radio Atómico	1.57 Å
Volumen Atómico	14.82 cm ³ /mol

[Pasa a la página 8...](#)

Viene de la página 7...

Polarizabilidad	5.4 Å³
Electronegatividad (Pauling)	2
Resistividad	0,957 Ω*mm ² /m pero a -268.88° Desaparece súbitamente su resistencia.
Solidifica	7.640 atmosferas (5.800.00 mm Hg) de presión
Es buen conductor de la electricidad	El mercurio ocupa el lugar 67 en abundancia entre los elementos de la corteza terrestre
Es el único metal líquido a temperatura ambiente	Forma amalgamas con oro, plata y plomo.

El mercurio existe en cuatro estados de oxidación: Hg^0 , Hg_2^{2+} , Hg^{2+} y Hg^{4+} . Este último estado ha sido descubierto recientemente en el 2007, a bajísimas temperaturas de alrededor de -260°C , formando el Tetrafluoruro de Mercurio (HgF_4). Las tres primeras especies se considera que coexisten en equilibrio, así todo el mercurio inorgánico disuelto en aguas oceánicas está 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 $\text{Hg}(\text{OH})_2^4$. El mercurio se disuelve fácilmente en ácido nítrico y agua regia; en menor grado solamente a temperaturas elevadas en ácido sulfúrico y ácido clorhídrico, formando sales de mercurio.



Figura 1. Mercurio elemental a temperatura de ambiente.

Entre los países que producen mayor cantidad de mercurio se encuentran España, Italia, la Unión Soviética y China. Los yacimientos más importantes se encuentran en Almadén (Ciudad Real- España), California (EEUU), Monte Amiata (Italia) e Istria (Yugoslavia).

El mercurio no es un elemento que este abundando en la corteza terrestre. Los cálculos arrojan un promedio de $80\mu\text{g}/\text{kg}$ en la corteza, si bien hay ciertas regiones en el planeta, donde se observan elevados niveles de concentraciones de mercurio, estos son relacionados principalmente por los depósitos minerales específicos. Se ha calculado que aproximadamente del total del mercurio presente en el medio ambiente, sólo un tercio es por emisión natural, y dos tercios por antropogénica⁸.

1.1.2. Ciclo del mercurio

El comportamiento biogeoquímico del mercurio es complejo, y su entendimiento requiere un estudio profundo de los procesos industriales, geológicos, atmosféricos, hidrológicos, químicos, fisiológicos, microbianos y ecológicos. Este metal al ser utilizado en distintos procesos antropogénicos, como la minería y la metalurgia es que también se ve acelerado y modificado.

Como todos los elementos químicos, el mercurio es transformado de un estado a otro por multitud de procesos de manera cíclica debido a la modificación que sufre por la influencia de muchos factores, como la temperatura, pH, presión y transformación por organismos⁹.

El mercurio se extrae como sulfuro de mercurio (mineral de cinabrio) calentando el mineral a más de $540\text{ }^{\circ}\text{C}$, se vaporiza el mercurio y es captado como mercurio metálico líquido, este a temperatura ambiente se evapora parcialmente, formando vapores de mercurio. La mayoría de mercurio que se encuentra en la atmósfera se encuentra como mercurio elemental, esto es como una valencia de cero (Hg^0)¹⁰, el cual es susceptible de ser transportado largas distancias. Gracias a su estabilidad, puede permanecer en la atmósfera entre seis meses y dos años, ya que es poco soluble en agua⁸. Debido a la reacción con O_3 y agua se forman nuevos compuestos de mercurio reactivo, es oxidado a la forma Hg^{2+} , el cual es muy inestable naturalmente, y Hg^{2+} , el cual su tiempo de residencia oscila entre horas y meses, ya que es más soluble en agua; por lo que, cae con la precipitación pluvial y es depositado en ambientes acuáticos y/o terrestres¹¹.

El mercurio elemental (Hg^0) puede ser depositado en la superficie de los vegetales o ser directamente respirado por los animales. El mercurio es un metal pesado y por lo mismo en gran medida termina acumulándose en el sedimento del río para recién entrar a la cadena trófica¹². También se depositan en las orillas de estos ríos donde es consumido por bacterias

y algas entrando de esta manera a la cadena trófica, luego como parte de los peces del río y finalmente a los pobladores que pescan en el río.

Una vez depositado en éste es movilizadado a través del suelo a efluentes y acuíferos donde el problema ambiental inicia debido a que de esta forma puede migrar a sitios en los que puede ser convertido de mercurio iónico Hg^{2+} , en compuestos organomercuriales, como metil y dimetilmercurio (CH_3HgCl , CH_3HgOH , $(CH_3)_2Hg$) esto es realizado por bacterias del suelo y del lecho marino, los cuales son muchos más perjudiciales ya que son mucho mejor asimilables por los seres vivos, esto debido a que tiene gran afinidad por los grupos sulfhidrilos de las proteínas. Este proceso se llama alquilación, que se favorece en los sedimentos acuáticos, especialmente en aquellos que presentan pH bajo (análogo al potencial REDOX), en sistemas ricos en ácidos orgánicos naturales y en flujos con pronunciadas fluctuaciones en el nivel del agua¹³.

Algunos de ellos son bastante solubles, por lo cual forman parte de los agregados de materia orgánica y arcilla del suelo, limitando su movilidad y provocando su acumulación. Otros son prácticamente inertes, como el HgS , debido a la gran afinidad del mercurio con el azufre⁷. Se estima que los océanos son los que mayor cantidad de mercurio poseen en forma de HgS con al menos $10^{17}g$ de mercurio, la biosfera tendría $10^{11}g$, mientras que en los suelos y sedimentos habría $10^{13}g$, la atmosfera estaría con 10^8g y por ultimo las aguas terrestres con 10^7g de mercurio¹³.

Cuando las condiciones de pH, temperatura, contenido de ácido húmico y materia orgánica favorecen la formación de compuestos inorgánicos como cloruro de mercurio ($HgCl_2$), sulfuro de mercurio (HgS), óxido de mercurio (HgO) y dihidróxido de mercurio ($Hg(OH)_2$).

Otra parte de las precipitaciones caen en los ríos y lagos, en donde una fracción de mercurio se revolatiliza y la otra queda unida al sedimento, el cual es transportado por las corrientes marinas a mares y océanos. En este ambiente también se forman compuestos orgánicos que son ingeridos por los animales acuáticos, provocando su bioacumulación, ya que estos animales tienen mayor capacidad para retener el metal⁸.

Las moléculas metilmercuriales tienen gran capacidad para unirse a otros compuestos, por lo tanto, tienen mayor afinidad a las partículas del suelo y agua, con las cuales se agregan

fácilmente y reducen su movilidad, lo que ocasiona un incremento en su concentración dentro de un área determinada⁸. A este proceso se le conoce como biomagnificación, que es el aumento de metales y otras sustancias por los sucesivos niveles tróficos.

La poca movilidad de estos compuestos mercuriales, no es impedimento para que, mediante la fuerza de gravedad, provoquen su lixiviación a través del suelo, llegando hasta ríos, los que finalmente llegan al mar y arrojan sus partículas lixiviadas. Con esto no solo se contaminan más regiones, si no que los rastros de mercurio llegan al humano mediante la pesca (el dimetilmercurio es el que se bioacumula mayormente en los peces) y el agua de riego. Siguiendo la cadena trófica, los humanos acumulan todo el metal presente en los organismos menores que consume, lo cual puede ocasionar distintas enfermedades tales como daños en el riñón, pulmones y disfunciones en el cerebro, hasta ocasionar la muerte⁸.

Por último, el mercurio vuelve a reducirse a su estado elemental gracias a la acción de diferentes factores biológicos y atmosféricos, como la reacción con ácidos húmicos, la luz solar o la acción de microorganismos que tienen la capacidad de reconocer moléculas tanto orgánicas como inorgánicas de éste. Una vez reducido puede volatilizarse de nuevo y comenzar el ciclo⁷. El ciclo vuelve a iniciar formando diferentes compuestos de mercurio.

Resumiendo, el ciclo biogeoquímico del Hg comprende básicamente las siguientes etapas, figura 2:

- Emisión de mercurio gaseoso (básicamente mercurio elemental) de rocas, suelos, aguas superficiales, emisiones volcánicas y actividades antropogénicas.
- Movimiento en forma gaseosa a través de la atmósfera tanto en sus formas de Hg⁰ y Hg²⁺.
- Deposición de mercurio en suelos y aguas superficiales, formando compuestos orgánicos e inorgánicos, Las especies oxidadas de mercurio se reducen a Hg⁰, por la acción de bacterias *Pseudomonas* en un proceso anaeróbico, para después seguir un proceso de migración.
- Conversión del mercurio en compuestos sulfatados solubles, por medios de bacterias.
- Precipitación o bioconversión del metilmercurio u otros compuestos organomercuriales.

- Reentrada a la atmosfera o bioacumulación en las cadenas alimenticias con la consecuente biomagnificación y efectos tóxicos para los seres vivos.

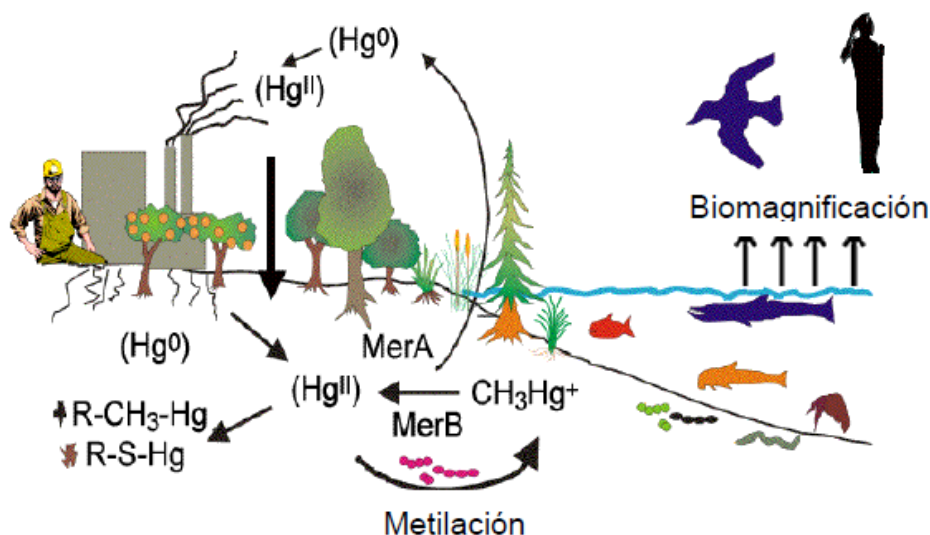


Figura 2. Ciclo biogeoquímico del mercurio¹⁴.

1.1.3. Formas químicas del mercurio

Existen varias formas químicas de mercurio en el medio ambiente como son:

Mercurio elemental (Hg^0)

Metal líquido a temperatura ambiente, color plateado, si no está encapsulado se evapora parcialmente, formando vapores de mercurio (incolores e inodoros). La mayor parte de los procesos que generan emisiones atmosféricas de mercurio elemental emplean altas temperaturas como la quema de combustibles fósiles, fundición de metales, producción de cemento, etc. El mercurio introducido con los insumos se volatiliza y se convierte en mercurio elemental (Hg^0), muchas veces conocido como azogue.

Hasta hace poco, no se consideraba que los compuestos inorgánicos de mercurio produjesen muchos efectos en las plantas, porque no se conocía que se adhieren a las partículas del suelo, sin embargo, la absorción de mercurio elemental gaseoso a través de las hojas puede ser mucho más eficiente que la absorción de mercurio del suelo (Hg^{2+}) por las raíces; por lo tanto, es posible que la principal exposición de las plantas sea atmosférica.

Formas inorgánicas

- Mercurio I (Hg-Hg)²⁺, ion mercurioso o mercurio divalente
- Mercurio II (Hg)²⁺, ion mercúrico.

Los compuestos inorgánicos de mercurio más conocidos son: sulfuro de mercurio (HgS), óxido de mercurio (HgO) y cloruro de mercurio (HgCl₂). Estos compuestos también se les conoce como sales de mercurio. La mayoría de estos compuestos inorgánicos son polvos o cristales blancos, excepto el sulfuro de mercurio que es rojo.

Formas orgánicas

El mercurio metálico se disuelve en ácidos orgánicos, y los compuestos inorgánicos de mercurio pueden reaccionar con sustancias orgánicas, formando compuestos orgánicos de mercurio, clasificándose en:

- Mercurios alcaloides (metilmercurio, etilmercurio, etc.)
- Mercurios ariloides (fenilmercurio, etc.)
- Diuréticos de mercurio

Las especies de mercurio y sus compuestos existentes en la naturaleza pueden dividirse según sus propiedades en:

- Muy volátiles: Hg⁰, (CH₃)₂Hg.
- Solubles en agua: Hg²⁺, HgX₂, HgX₃⁻, HgX₄²⁻ (X =OH⁻, Cl⁻, Br⁻) y Hg₂²⁺.
- Poco solubles en agua: CH₃HgCl, CH₃HgS⁻, Hg(CN)₂.

1.1.4. Fuentes de emisión de mercurio

Se consideran dos clases de emisiones de mercurio, las naturales y las emisiones por actividades industriales (tanto orgánicas como inorgánicas).

Origen natural

Las emisiones naturales son aquellas que se liberan por el ciclo normal del mercurio, debido a la desgasificación de la corteza terrestre, la actividad volcánica, la degradación de minerales, los incendios forestales y de la evaporación de los cuerpos de agua¹⁵. Este tipo de

emisiones es muy difícil de cuantificar. Estas emisiones no se pueden controlar por lo tanto son emisiones que se consideran parte del entorno local y mundial.

Origen antropogénico

Las emisiones por actividades industriales, son resultado de la generación eléctrica, de impurezas en las materias primas como también de combustibles. La cantidad total de mercurio liberada a la atmosfera debido a actividades antropogénicas ha sido estimada en 2000 a 6000 toneladas por año¹⁶. Las fuentes más importantes de emisión de mercurio son:

- La industria del cloro
- La quema de combustibles fósiles (liberan mercurio elemental)
- Industria del papel de pulpa de madera (compuestos de fenilmercurio)
- Fabricas químicas (compuestos de metilmercurio son desechados)
- Minería y actividades metalúrgicas (extracción de oro, hierro, zinc)

La contaminación con mercurio en Sudamérica, en particularmente en Brasil, Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia es originada en los procesos de beneficio del oro, el cual es extraído mezclando la roca triturada enriquecida con el metal precioso con mercurio metálico para formar una amalgama, la cual es presionada para remover el exceso de mercurio. Esto ocasiona el derramamiento de grandes cantidades del metal en los ríos y en cuerpos de agua como ciénagas y lagunas. La amalgama mercurio-oro obtenida es quemada usualmente a campo abierto dejando libre el oro y liberando el toxico metálico en forma de vapor directamente a la atmosfera. Estos procesos generalmente son realizados cerca de las viviendas de los mineros, de tal forma que las familias respiran gran parte del vapor de mercurio volatilizado¹⁷.

1.1.5. Usos del mercurio

El mercurio es usado en un sin número de industrias y actividades a pesar de que se considera un elemento tóxico, algunos de las aplicaciones de este elemento se encuentran en:

- Cátodo en la electrolisis de la solución del cloruro de sodio para producir sosa caustica y cloro gaseoso. (10tn de mercurio por planta de procesamiento).
- Amalgamas dentales (contienen 50% de mercurio)

- En la industria eléctrica (lámparas, rectificadores de arco y en celdas de las baterías de mercurio).
- Termostatos, termómetros, barómetros.
- En pinturas (evitan hongos).
- Amalgamación del oro (minería informal).
- Etilmercurio (Timerosal o mertiolate) utilizado en desinfección y vacunas (figura 3).
- Como desinfectante intestinal y en forma de pomadas para tratar enfermedades en la piel (cloruro mercurioso, calomelano).
- Como antiséptico (el cloruro mercuríco).
- Mezclas de detonantes en la metalurgia del oro y de la plata (se usa el fulminato de mercurio).

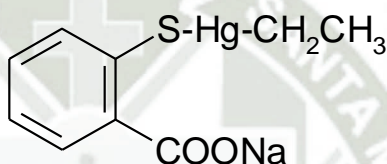


Figura 3. Molécula de Timerosal o Mertiolate.

1.1.6. Efectos tóxicos del mercurio

El mercurio es considerado uno de los elementos más peligrosos para el hombre, no se puede descomponer ni degradar en sustancias inofensivas. Este elemento y todos sus compuestos son tóxicos, volátiles, persistentes en el medio ambiente y rápidamente dispersados en la atmosfera, en particular las especies de halogenuros de metilmercurio (CH_3HgX ; donde X puede ser Cl^- , Br^- o I^-), las cuales corresponden a las formas más tóxicas existentes del metal, precisamente las formas más comunes que encontramos en el medio ambiente son el mercurio metálico, sulfuro de mercurio, cloruro de mercurio y metilmercurio, éste último es muy venenoso puesto que nuestro organismo no es capaz de eliminarlo totalmente.

Las reacciones del mercurio con los compuestos orgánicos son muy complejas y se pueden sintetizar en los siguientes puntos:

- Las bacterias aerobias y anaerobias transforman Hg^{2+} en metilmercurio (compuesto peligroso).
- Estos microorganismos pueden volver a metilar el metilmercurio formando dimetilmercurio. Este último puede transformarse en Hg^0 por la acción de bacterias productoras de metano.

- En condiciones anaerobias, es frecuente la aparición de HgS de muy baja solubilidad.
- En condiciones aerobias, este HgS se transforma en HgSO₄ que fácilmente se disocia produciendo Hg²⁺.
- En pH ácido y en presencia de Hg²⁺ el dimetilmercurio se transforma en metilmercurio.
- El metilmercurio en presencia de grupos -SH puede descomponerse por fotólisis en metano y HgS.
- De igual forma puede formarse fenilmercurio y difenilmercurio.

En general todas las formas de mercurio que entran en los sistemas acuáticos son susceptibles de convertirse en metilmercurio.

Se evidenció la contaminación por bioacumulación de mercurio en peces y mariscos que fueron digeridos por personas en la bahía de Minamata en Japón en 1956, y el consumo de semillas y cereales contaminados en Irak en 1971-1972. Este efecto se debe al metilmercurio, que induce perturbaciones irreversibles completas en el sistema nervioso central. Quizá uno de los efectos del metilmercurio que más han impactado a la humanidad ha sido su capacidad teratogénica¹, la teratogenicidad consisten en alteraciones del desarrollo del embrión o del feto lo cual puede generar malformaciones congénitas. Entre habitantes de Minamata (Japón) contaminados con metilmercurio fue frecuente el nacimiento de niños con microcefalia (disminución del tamaño del cerebro), ausencia o disminución de la longitud de las extremidades, sordera y ceguera¹⁸.

Esta serie de daños ocasionados por intoxicación con metilmercurio recibe el nombre de Enfermedad de Minamata debido justamente a la contaminación en Japón, en la figura 4 se muestra algunas fotografías de los sobrevivientes de esta enfermedad, éstas se encuentran en el Museo de la Enfermedad de Minamata.

Para hacer una pequeña reseña, en la ciudad de Minamata la compañía Chisso sintetizaba acetaldehído a partir de acetileno utilizando sulfato de mercurio (II) como catalizador, parte del cual era metilado antes de incorporarse a las aguas de la bahía. Por esta reacción se producía metilmercurio, que era captado por el fitoplancton e incorporado en altas concentraciones en varias especies de la cadena alimenticia, que al final repercutía en la población local cuyo principal alimento era el pescado. A los meses, 121 personas fueron

intoxicadas y 46 fallecieron^{19,20}. Previamente a la aparición de esta intoxicación, fue posible detectar cambios en el comportamiento de organismos tales como flotación de los peses de la bahía, movimiento involuntario de los gatos e incapacidad de volar de las aves marinas, etc.²¹.

Se han llevado a cabo diferentes estudios con el objetivo de conocer en profundidad los efectos tóxicos que produce el Hg y sus derivados en los seres vivos.



Figura 4. Fotografías de los efectos de la enfermedad de Minamata, presentes en el Museo de la Enfermedad de Minamata en Japón¹⁸.

El otro incidente que mencionamos fue la intoxicación en Irak, este país importó grandes cantidades de cereales (trigo y cebada) tratados con metilmercurio, usado como funguicida, y distribuyó el grano para la siembra. Pero a pesar de las advertencias, el grano fue molido y usado para hacer pan, como resultado 6530 víctimas fueron hospitalizadas de las cuales murieron 459 en tan solo dos meses²². Hubo además otros incidentes por ejemplo a lo largo del río Agano en Niigata, Japón²⁰, Pakistán, Guatemala y Ghana²³.

Además, el mercurio elemental puede tener efectos negativos en la salud cuando son aspirados bajo la forma de vapor y depositados en los pulmones. Esto puede ser consecuencia de una exposición a derrames de mercurio o a la ruptura de materiales que lo contienen y exponen al metal al aire, particularmente en habitaciones cálidas o pobremente ventiladas.

Otras fuentes de exposición al mercurio también son las amalgamas dentales, usos domésticos y a las emisiones provenientes de carbón y a residuos mercuriales, así como al contacto con mercurio en suelos, al minado y recuperación de metales preciosos, etc.

Según un estudio publicado por la US-EPA, el 2007, el mayor uso del mercurio en el 2004 estuvo dirigido a la fabricación y producción de cables e interruptores eléctricos (63 toneladas) seguido por el empleo en odontología (35 toneladas) y cloro álcalis con 14 toneladas; aunque también este informe precisa que se redujo el uso de este metal en un 50% desde 1995²⁴.

La intoxicación de este metal se denomina hidrargirismo, y se manifiesta con ulceraciones en las encías, ennegrecimiento de los dientes, vómitos, diarreas, temblores. La toxicidad depende mucho de la forma química, por lo que los síntomas y signos de intoxicación varían según se trate la exposición al mercurio elemental, a los compuestos orgánicos o inorgánicos²⁵.

Debemos tener en cuenta que también existe contaminación por el proceso de quema de otros materiales que se les ha añadido el metal, por ejemplo, baterías, amalgamas dentales, termómetros, productos químicos de laboratorio, ciertos interruptores eléctricos (como termostatos y bombas, pinturas, y más recientemente los llamados focos ahorradores, entre otros) como parte de su proceso de fabricación.

Según el reporte de The Mercury Project (2009) alrededor del 50% del consumo mundial de mercurio se destina a la fabricación de estos productos anualmente y que mucho del metal termina en la corriente de desechos, la mayoría de los cuales termina siendo incinerado²⁶.

Cerca del 80% de los vapores inhalados son absorbidos por los tejidos pulmonares, el cual es la principal vía de exposición al mercurio elemental. Este vapor penetra fácilmente la barrera de sangre del cerebro, en cambio la absorción intestinal de mercurio elemental es baja.

La exposición a mercurio elemental a la que están expuestos los mineros auríferos, odontólogos, personas con amalgamas dentales y trabajadores de plantas de producción de cloro, pueden generar déficit en el desarrollo neurológico y de comportamiento, lo cual puede incluir daños sutiles en la memoria visual, atención y velocidad en las repuestas visuales, auditivas y psicomotoras, perdida reversible de la capacidad para distinguir colores, además de inflamaciones severas de la piel, entre otros efectos²⁷.

En cuanto a carcinogenicidad, la evaluación general del IARC (Agencia Internacional de Investigación de Cáncer, 1993) concluye que el mercurio metálico y los compuestos inorgánicos de mercurio no son clasificables en cuanto a carcinogenicidad para los seres humanos, mas no los compuestos de metilmercurio, que si los considera carcinógenos para el ser humano.

Como se mencionó el compuesto más tóxico es el metilmercurio, esto se debe a su capacidad de disolverse en los lípidos, se acumula en el sistema nervioso e hígado de los animales superiores. Adicionalmente las altas exposiciones al mercurio inorgánico pueden dañar el sistema digestivo, el sistema nervioso y los riñones, debido a que tanto el Hg orgánico e inorgánico tienen afinidad por los grupos tiol (-SH) de las enzimas y proteínas, resultando en su inactivación y la consecuente interrupción de las actividades celulares normales. Producen daño bioquímico a los tejidos y al ADN mediante la alteración de la homeostasis del calcio intracelular, el potencial de membrana, modificando los procesos de síntesis e interrumpiendo las vías excitatorias del sistema nervioso central. Tanto el mercurio orgánico como el inorgánico son absorbidos vía el tracto gastrointestinal y desde aquí afectar a otros sistemas. La principal fuente de exposición más significativa es la dieta a base de pescados y mariscos.

Los efectos tóxicos del metilmercurio están mejor caracterizados que de otros compuestos orgánicos de mercurio, además el metilmercurio y el etilmercurio son similares en toxicidad.

El metilmercurio es un neurotóxico, que provoca efectos terribles particularmente en el cerebro en formación. Además, este compuesto traspasa la barrera placentaria y la barrera hematoencefálica; por eso es muy preocupante la exposición durante el embarazo. También algunos estudios indican que incluso un pequeño aumento en la exposición al metilmercurio puede causar efectos perjudiciales en el sistema cardiovascular. Todos estos daños resultan en la irritabilidad, pérdida de la sensibilidad en las extremidades, dificultades en la visión y la audición, temblores, daño renal y eventualmente, la muerte.

Las plantas pueden tomar el Hg del suelo y acumularlo en sus tejidos, lo que implica un riesgo debido a su posible transmisión a los animales y seres humanos a través de la cadena alimentaria²⁸. Diversos autores han demostrado la presencia de Hg en plantas cultivables que

crecen en suelos contaminados con este metal, indicando que estos incluyen la alteración del sistema antioxidante y de la fotosíntesis e inhibición del crecimiento, consumo de nutrientes, homeostasis en general y disminución del rendimiento de las plantas²⁹.

1.2. SITUACIÓN DEL MERCURIO EN EL PERÚ Y MINERÍA INFORMAL

En Sudamérica el mayor uso del mercurio está dirigido a la minería artesanal además de la producción de cloroálcalis, amalgama dental, entre otros usos³⁰.

En el Perú, el uso del mercurio en la extracción artesanal de oro data desde la época moche. En el periodo comprendido entre 1990 y 1999 la producción de oro artesanal alcanzó un aproximado de 20 toneladas por año del metal, según estadísticas del Ministerio de Energía y Minas.

En el presente siglo, en el 2001 aproximadamente el 17% de la producción total de oro provino de la minería artesanal a partir de vetas y ocurrencias aluviales, y donde este total, el 70% se obtuvo en Madre de Dios. El 2004, la extracción artesanal de oro fue del 9% del total del oro producido en el país. La cuenca baja del río Madre de Dios se encuentra afectada por la extracción ilegal del oro, la que se realiza con el uso de dragas hidráulicas ilegales a lo largo del río y el uso del mercurio para separar el oro. Se trata de una minería itinerante en la que no se considera ningún tratamiento de los relaves. Ello contamina el agua, la fauna y la flora y a la población local cuya principal fuente de proteína es la pesca. En esta zona existen alrededor de 15000 personas que dependen de esta actividad, aquí 15 mil hectáreas ha sido degradadas y 400 mil están amenazadas³¹.

El principal método de uso del mercurio en la minería informal es para separar y extraer el oro de las rojas o piedras en las que se encuentra. El mercurio se adhiere al oro, mediante la amalgamación. Posteriormente, esta amalgama, es sometida a calor para vaporizar el mercurio y dejar el metal precioso en el fondo del recipiente.

En muchos casos solo el 10% del mercurio agregado a una batea se combina con el oro para producir la amalgama. El restante (90%) es sobrante y debe retirarse y reciclarse, o se libera al medio ambiente. Cuando se amalgama todo el mineral, aparecen altos niveles de mercurio que se propagan en el medio ambiente local y crean graves problemas de salud por exposición, tanto para los mineros como para otras personas.

En otros casos el oro se concentra con las partículas más pesadas en la batea, el agua se lleva las partículas más livianas, luego se agregar mercurio al concentrado para amalgamar o juntar las partículas finas de oro, este procedimiento es mejor que amalgamar todo el mineral.

Finalmente, las amalgamas se colocan en una pala o cazo de metal y se quema directamente sobre el fuego, a cielo abierto. Cuando es se hace sin usar una retorta, los vapores de mercurio escapan al aire y son inhalados por los mineros, sus familias y demás personas que se encuentren cerca. Con este procedimiento se recupera todo el oro extraído.

Esta actividad en el Perú es considerada ilegal, es por ello que no se cuenta con cifras de extracción ni de niveles de contaminación. En la región Arequipa, donde más se extrae el oro ilegalmente es en la provincia de Caravelí, allí hay cobre, hierro, pero principalmente oro, es así que el 70% de la minería informal de Arequipa está en esta provincia, el distrito de Chala se ha convertido en la capital de esta actividad pues allí se concentran plantas procesadoras formales y es el punto hasta donde llegan los mineros, tanto de las diferentes zonas de Arequipa como de Ayacucho.

Ellos extraen el oro abriendo socavones en zonas como el valle de Cháparra, Quicaña, Huanuhuanu, Tocata, Atico, Cahuacho y Acarí, todas estas zonas están en Caravelí, también extraen el mineral de zonas de Camaná, La Unión y Caylloma; y es justamente en Caylloma en el distrito de El Pedregal es donde existen varias plantas chancadoras, que usan los Quimbaletes (piedras grandes para moler el mineral), que se ubican en asentamientos humanos, zonas periféricas al centro poblado, teniendo a casas familiares como fachada y que en su interior se encuentran estos Quimbaletes (figura 5), hasta ahí llegan camiones cargados de sacos conteniendo el mineral extraído de distintas zonas de Caylloma y Camaná, una vez que van entrando a los Quimbaletes, se va añadiendo el Mercurio, para que forme una amalgama con el oro y éste es el que se separa y se lleva hasta la localidad de Chala donde se procesa el mineral, existe otro centro de procesamiento en Nazca, en la región Ica.

En Chala existen plantas procesadoras formales que paradójicamente con las que compran el mercurio a los mineros informales, entre ellas están minera Titán, Colibrí, Paraíso, Laytaruma, Dinacor, entre otras. Existe un vacío legal, por el cual estas empresas formales

no están obligadas a verificar la procedencia del mineral. La forma en que trabajan estas procesadoras formales es vendiéndoles explosivos y mercurio a estos informales.



Figura 5. Asentamientos humanos en el distrito de El Pedregal, donde se ubican loas chancadoras de mineral informales.

En este proceso de compra y venta entre los mineros y las plantas procesadoras, también entran a tallar los facturadores. Este es un modo de legalizar el mineral. Cuando existe una factura de por medio, las plantas pagan no sólo el valor del mineral sino también el 18% del IGV (Impuesto General a las Ventas). Del monto total se distribuyen 30% para el facturador y 70% para el minero. Los mineros prefieren hacer esto, pues la planta sólo les pagaría el 50% del valor del mineral.

En esta etapa, la venta del oro se hace de diversos modos:

- Cuando el material es chancado y mezclado con tierra, el precio a pagarse está sujeto a la evaluación que haga el comprador, generalmente se lleva una muestra para que sea analizada en laboratorio y determinar la ley del mineral.
- Otro modo es utilizando mercurio y los quimbaletes para separar el oro de la tierra. Este proceso requiere agua, y que llega a formar amalgamas con el mercurio y el oro, los cuales son quemados para purificar más el oro. Los relaves que quedan de este proceso también son vendidos a las plantas procesadoras, que los compran por toneladas y usan la cianuración para extraer el oro más puro. Igualmente se paga según la ley y el grado

de humedad. El pago siempre está regulado al precio internacional del oro. Este proceso como vimos trae serios problemas a la salud como al medio ambiente.

Todos estos procesos informales y artesanales, conllevan un problema ambiental ya que se el mercurio usado se emplea de una forma indiscriminada, dispersándose no solo en las zonas donde se ubican las chancadoras, contaminando los suelos; si no, en los alrededores por ser volátil, afectando a los trabajadores y población aledaña incluyendo niños, jóvenes, mujeres que a un largo plazo pueden presentar problemas de salud. Además, trae un problema social, ya que las personas que se involucran en esta cadena de trabajo no tienen beneficios sociales, ni acceden a programas sociales, créditos, etc.

En el Perú existe una norma que regula las descargas mineras, este es el Decreto Supremo (D.S.) 010-2010-MINAM (Ministerio de Agricultura) que regula los límites máximos permisibles para la descarga de efluentes líquidos de actividades minero – metalúrgicas, en donde señala que para el caso del Mercurio establece un límite máximo de descarga de 0.002ppm. (Anexo 1).

1.3. METODOS FISICOQUIMICOS DE REMOCION DE Hg.

La literatura reporta la existencia de numerosas tecnologías que permitan el tratamiento de mercurio, entre las que se indican la precipitación; coagulación/coprecipitación, y la adsorción con carbón activado. También se tiene el intercambio iónico que históricamente ha estado limitado al uso de resinas aniónicas para procesar aguas residuales industriales con contenido de mercurio inorgánico.

Otras tecnologías incluyen la reducción química, separación por membranas, técnicas emergentes como adsorción de macrociclos, extracción por membranas, amalgamación, formación de sulfuros, desorción térmica, electro-remediación, procesos de encapsulación, etc.

Se puede obtener buenos resultados si la elección de la tecnología o método a aplicar se realizada de manera adecuada, en función a las características físico-químicas de cada efluente y/o las condiciones del ambiente contaminado³². Algunas de estas tecnologías de remediación son las siguientes:

Solidificación/estabilización (in situ o ex situ) Es la tecnología más frecuentemente utilizada para el tratamiento de suelos y desechos contaminados. La literatura reporta que esta tecnología ha sido empleada para lograr niveles de limpieza establecidos por la regulación, y es disponible comercialmente para el tratamiento de suelo y residuos, y genera un residuo que usualmente no requiere tratamiento posterior antes de su disposición final. Por otra parte, se usa también el lavado de suelos/extracción acida (ex situ) utilizada en primer lugar para tratar suelos con bajos contenidos de arcilla ya que estos tienden a separarse en finas fracciones altamente contaminadas. Es poco efectivo para suelos con altos contenidos orgánicos, porque la fracción orgánica interfiere con la eliminación del contaminante. Además, otros autores hablan sobre el tratamiento térmico (ex situ) igual que la deseción térmica o retortado, es usado rutinariamente para tratar residuos médicos e industriales que contienen mercurio, pero no es adecuado para suelos con alto contenido de arcilla o materia orgánica y requiere el tratamiento de gases mercuriales. De otro lado la Vitricación (in situ o ex situ) puede ser empleado cuando una combinación de contaminantes está presente y que no pueden ser tratados usando solo solidificación/estabilización. También se emplea para desechos con alto contenido de materia orgánica. A todo esto, la precipitación/coprecipitación es la tecnología más frecuentemente usada para el tratamiento de aguas contaminadas. La efectividad de este proceso no se ve afectada por la presencia de características o contaminantes que afectan a otras tecnologías. Aunque requiere operadores calificados es un proceso más efectivo a gran escala. Se habla también de la Adsorción que es un método que puede verse afectado por las características del medio y de los contaminantes cuando se lo compara con el tratamiento anterior. Los sistemas pequeños que emplean esta tecnología suelen tener bajos costos operativos y de mantenimiento.

La adsorción se usa con mayor frecuencia en situaciones en las que el mercurio es el único contaminante a ser eliminado, para sistemas relativamente pequeños. Sin embargo, la Filtración de membrana es efectiva para el tratamiento de mercurio, pero su uso es menos frecuente debido a que su costo tiende a ser elevado y produce un gran volumen de residuos que otras tecnologías. Es muy sensible a una variedad de contaminantes y características presentes en el agua sin tratamiento. Se debe prevenir el taponamiento de la membrana por la presencia de sólidos suspendidos, compuestos orgánicos, coloides, entre otros.

Sin embargo, estos métodos poseen algunas desventajas, tales como sus altos costos, utilización de grandes cantidades de reactivos y sus efectos adversos sobre los ecosistemas,

etc. Es por ello que salta la necesidad de aplicar otras tecnologías de remediación más eficientes, económicas y amigables con el medio ambiente. Es por ello que se focaliza la investigación en métodos biológicos, donde se utilizan organismos vivos para reducir, eliminar, contener o transformar los contaminantes en suelo, agua y aire³³.

1.4. METODOS BIOLÓGICOS DE REMOCIÓN DE Hg

Como mencionamos este tipo de métodos usan organismos vivos, estos organismos pueden ser bacterias y hongos (bioremediación), microalgas (ficroremediación) o plantas (fitoremediación), acción conjunta de microorganismos rizosféricos y plantas (rizoremediación)

La bioremediación de mercurio ha probado ser una tecnología efectiva para el tratamiento de la contaminación con este metal. Sea *in situ* o *ex situ*.

El proceso se basa fundamentalmente en la capacidad de ciertos grupos biológicos de soportar altas concentraciones de mercurio presentes en los medios donde se encuentran. Los mecanismos de esta resistencia se encuentran codificadas en genes que les permite modificar la forma contaminante (generalmente metilmercurio) y transformarlo en una forma menos tóxica o en mercurio elemental. Adicionalmente, puede presentarse una acumulación o retención del químico en la biomasa microbiana, algunos métodos para la remoción de mercurio la describimos brevemente a continuación.

1.4.1. Fitoremediación

La fitoremediación involucra el uso de plantas naturales o modificadas genéticamente, para remover diversos contaminantes del suelo y/o aguas. En este método con plantas existen cuatro diferentes tecnologías para la remediación de suelos, sedimentos o agua contaminados con metales, cada una con mecanismos de acción diferentes³⁴, estas son:

- **Rizofiltración**, implica el uso de plantas para remediar diversos ambientes acuáticos.
- **Fitoestabilización**, donde las plantas se utilizan para estabilizar los contaminantes del suelo más que para removerlos.
- **Fitovolatilización**, implica el uso de plantas para extraer ciertos metales del suelo y luego liberarlos en la atmosfera para volatilización.

- **Fitoextracción**, donde las plantas absorben los metales del suelo y los translocan a los tejidos aéreos, donde estos se acumulan.

En los últimos tiempos existe una tendencia a realizar mejoramiento genético a ciertas especies vegetales (transgénicos) para que presenten la capacidad de tolerar altas concentraciones de mercurio en el suelo y eliminar (o disminuir) su capacidad toxica².

Entre las especies vegetales a la que se le ha insertado esta capacidad está *Arabidopsis thaliana*, gracias a la inclusión y expresión del gen *MerA* de *Escherichia coli*, mostrando que no solo es capaz de absorber y concentrar iones mercurio sino también reducirlo a un mercurio elemental menos tóxico, que posteriormente es evaporado de la célula³⁵.

Se ha demostrado que las plantas que llevan el gen *merA* modificado son capaces de extraer, secuestrar y descontaminar los contaminantes mercuriales. Estas características también han sido expresadas en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) y otras especies².

1.4.2. Ficoremediación

Uno de las ramas principales de la biotecnología, es justamente el uso de las algas para el control y o remoción de compuestos inorgánicos, siendo la eliminación de metales pesados de efluentes industriales y aguas residuales domésticas uno de estos principales focos³⁶.

Varios investigadores han estudiado algas con mecanismos de remoción de Hg extracelulares, así, por ejemplo, se observaron que diferentes especies pertenecientes a los géneros *Scenedesmus*, *Chlorella* y *Oscillatoria* fueron capaces de adsorber Hg (entre un 10-40% de 100 mg/L)³⁷. Se estudió también el uso de tecnologías como la inmovilización en alginato, donde se observó que la acumulación de Hg²⁺ fue mayor que en células libres. Así mismo, se sabe que la *Dunaliella*, pudo tolerar y adsorber 67% de 30 mg/L Hg²⁺ en una hora³⁸.

Los mecanismos de remoción de metales en estas algas, se han descrito la actividad de las metalotioneinas (clase III) (MtIII), las cuales están presentes en más de 11 algas pertenecientes a 6 géneros. Estas MtIII puede ser inducida por diferentes metales, entre ellos Hg²⁺.

Asimismo, también se han realizado investigaciones con algas modificadas genéticamente para una mayor remoción de contaminantes ya sean compuestos clorados, hidrocarburos aromáticos, metales pesados, y sustancias tóxicas no polares³⁹, un ejemplo es la utilización de la microalga *Chlorella sp.* DT, transformada con el gen mera de *Bacillus megaterium* MB1, para eliminar Hg^{2+} , las cuales mostraron una mayor capacidad de eliminar el contaminante⁴⁰.

1.4.3. Rizoremediación

Es la actividad de remoción o inmovilización de contaminantes de manera conjunta entre plantas y microorganismo que habitan en su rizósfera. Este concepto implica el uso de plantas con su rizósfera asociada. La rizósfera es la zona en la cual los metales entran en contacto con las raíces de las plantas, constituyendo una interface suelo-planta de gran importancia en el proceso de fitoremediación. Las plantas ayudan a crear su propia rizósfera por la secreción de diferentes enzimas y moléculas pequeñas, y mediante el ajuste de pH del suelo.

Esta es un área relativamente nueva dentro del grupo de la bioremediación, varios grupos de trabajo están explorándola debido al alto potencial que esta posee, aunque tiene la desventaja de la complejidad de los diseños experimentales que se usan⁴¹.

1.4.4. Bioremediación

Las observaciones sobre la presencia y distribución de bacterias nativas capaces de tolerar altas concentraciones de metales son de vital importancia en la ecología microbiana para entender en toda su extensión la contaminación por metales, así como reflejar la habilidad de estas formas nativas para sobrevivir en ambientes extremos y conocer además sus funciones que expliquen este comportamiento⁴².

A pesar de que las bacterias pueden reducir el mercurio por varios métodos, la forma más eficiente de hacerlo es mediante una serie de genes que se han ido desarrollando para sobrevivir al ambiente tóxico provocado por las altas concentraciones del metal. Esta reducción es 10 veces mayor que cualquiera otra⁴³.

Las bacterias resistentes al mercurio (MRB-Mercury Resistant Bacteria) están ampliamente distribuidas en la naturaleza, totalizando aproximadamente entre el 1 al 10% del total de

bacterias heterotróficas aeróbicas. Pueden ser aisladas sin enriquecimiento previo, sin embargo, cepas más resistentes son más abundantes en ambientes contaminados con mercurio, donde hasta el 50% puede desarrollar en agar nutriente con concentraciones altas como 50 μM (10 ppm) Hg^{2+} , mientras que las cepas sensibles solo pueden tolerar, en el mejor de los casos hasta 1 μM en el medio de cultivo².

La presencia de MRB esta frecuentemente correlacionada con el nivel de contaminación mercurial en un ambiente, aunque también puede ser aislada en ambientes no contaminados.

Los microorganismos pueden sobrevivir a elevadas concentraciones de sales mercuriales debido a diferentes mecanismos⁴⁴, estos mecanismos están generalmente clasificados en los siguientes grupos:

- **Reducción enzimática a Hg° y volatilización**

El mecanismo más común de resistencia al mercurio en las bacterias es la reducción enzimática de iones de mercurio bivalente (Hg^{2+}) a su forma elemental (Hg°) por la flavoenzima citoplasmática mercurio-reductasa. Estos mecanismos han sido estudiados en profundidad desde la década del '60. Moore reporto por primera vez en 1960 una bacteria resistente de *Staphylococcus aureus*, que también era resistente a penicilina. A partir de este descubrimiento, varios estudios han demostrado que ambas resistencias están presentes, en la mayoría de los casos, en plásmidos⁴³. Esta resistencia está dada por una serie de genes llamados *mer*, que varían en número dentro del operón del mismo nombre.

El operón *mer* está constituido por genes que codifican para proteínas asociadas con varias funciones tales como regulación, transporte y reducción. Este *operon mer*, un dedicado conjunto de genes resistentes al mercurio que son autorregulados por la proteína MerR enlazada al ADN. Las bacterias resistentes al mercurio iónico y el metilmercurio codifican proteínas que regulan el transporte de mercurio (MerA, MerP y MerT) y la degradación del metal (MerA y MerB)

La estructura del operón *mer* varía entre las distintas especies bacterianas, encontrándose dos tipos de operones: de espectro reducido (confiere resistencia a Hg inorgánico) y de espectro amplio (confiere resistencia a Hg inorgánico y orgánico).

Estos genes codifican para una serie de enzimas que pueden demetilar el Hg orgánico a Hg inorgánico y reducir este último a Hg⁰, el cual es menos tóxico y se puede liberar al medioambiente debido a su alta volatilidad.

El mecanismo común de destoxificación de Hg²⁺ en todos los determinantes de resistencia al mercurio en bacterias Gram negativas es el transporte de iones Hg²⁺ hacia el citoplasma seguido de su reducción a la forma de mercurio elemental, Hg⁰. El transporte o captura de mercurio se debe al transportador específico *MerT* (y en algunos casos a los transportadores auxiliares *MerC* y/o *MerF*). El mercurio elemental parece ser eliminado por difusión pasiva desde la célula bajo condiciones fisiológicas normales.

La consiguiente volatilización del mercurio remueve este material del ambiente circundante antes de que ocurra una re-oxidación, estos mecanismos del operón *mer* se aprecia en la figura 6.

Según Barkay⁴³, el motor principal de la resistencia al mercurio es la proteína MerA, flavoproteína homodimérica, dependiente de NADPH que reduce Hg²⁺ a Hg⁰. Su acción es tan rápida que es imposible medir la acumulación de mercurio en la célula. A diferencia de otras proteínas de la misma familia, MerA tiene una estructura que ayuda a evitar la inhibición por Hg²⁺.

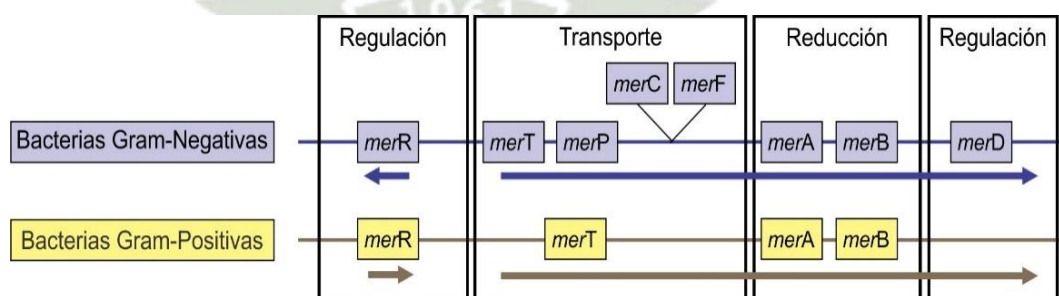


Figura 6. Organización general de un operón *mer* de amplio espectro en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Las flechas indican el sentido de transcripción⁴⁵.

Bacterias especializadas pueden desarrollarse de manera natural en ambientes contaminados con metilmercurio debido a que son capaces de producir la enzima

degradadora de metilmercurio llamada MerB. Debido a su única habilidad de romper los enlaces mercurio-carbono, la enzima MerB es crucial en los esfuerzos para limpiar este compuesto de cursos de aguas contaminadas.

Tenemos que indicar que los compuestos de mercurio son tóxicos debido a que se enlazan muy fuertemente a los grupos thiol presentes en las proteínas. El sistema *mer* explota esta propiedad al unirse a los compuestos mercuriales que tienen gran afinidad por los residuos de cisteína que contienen grupos thiol².

Estos grupos thiol son críticos no solo para las reacciones enzimáticas de MerA y MerB sino también por la transferencia directa del mercurio iónico entre miembros del sistema *mer*, minimizando la posibilidad de unión de los compuestos de mercurio a otras proteínas dando lugar a la toxicidad, como se muestra en la figura 7.

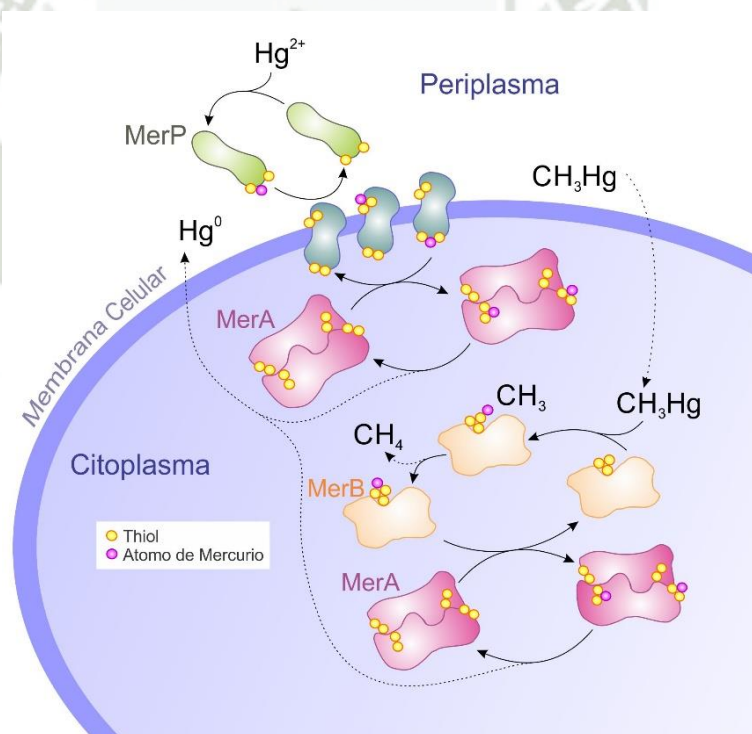


Figura 7. “Mecanismo de acción de las enzimas Mer en presencia de Hg”².

- **Formación de HgS insoluble y otros mecanismos de tolerancia**

Se han descrito también otros mecanismos de tolerancia a diversos metales pesados, entre ellos se incluyen la precipitación de los mismos con fosfatos, carbonatos y/o sulfuros.

El sulfuro de mercurio (HgS) puede formarse por la reacción directa de Hg^{2+} con el Hg_2S producido anaeróbicamente por la bacteria *Clostridium cochlearium*; aunque también se reporta la capacidad de *Klebsiella aerogenes* de producir HgS cuando se lo cultiva de manera continua en un ambiente aeróbico.

Algunos investigadores han manifestado que la acumulación o secuestro intracelular o secuestro intracelular del mismo sería un proceso de remoción más adecuado. En algunos trabajos se detalló un novedoso mecanismo de secuestro intracelular de Hg en algunas cepas de *Enterobacter sp.*, las cuales bioacumularon el metal en forma de nano partículas de 2-5nm⁴⁶.

En otros estudios se determinaron que la producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), en mayor medida, como así también la precipitación de Hg^{2+} con compuestos sulfurados u organosulfurados, serían los principales mecanismos de secuestro de Hg iónico, en algunas bacterias aisladas de ambientes contaminados con metales, las cuales no poseen o expresan el operón *mer*⁴⁷.

En los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios sobre la utilización de biomasa bacteriana, viva o muerta, como bioadsorbente de diversos metales, es así que se llegaron a inmovilizar cepa de *Bacillus cereus* en alginato de calcio, con la cual obtuvieron elevadas eficiencias de remoción de Hg^{2+} a través de bioadsorción a la biomasa bacteriana (80% de remoción de 20 mg/L iniciales de Hg^{2+} , en 120 horas), tanto en ensayos batch como en sistemas continuos⁴⁶.

- **Remoción de mercurio en aguas residuales**

Las bacterias también presentan la capacidad de remover el mercurio presente en aguas residuales. Se reporta que la capacidad de *Klebsiella pneumoniae* de usar tres distintos mecanismos para la remoción de mercurio⁴⁴.

Wagner- Döbler, resume los resultados obtenidos después de 2 años de trabajo en una planta piloto construida para tratar efluentes de una industria de electrólisis de cloro-álcali de la Republica Checa. En este trabajo se utilizó un biorreactor de lecho empacado con una capacidad para tratar 100 m³ de efluente por día (conteniendo entre 2 y 10 mg/L

de Hg), que opero de manera continua durante 8 meses con excelentes resultados. Se inoculo con un biofilm bacteriano, conformado por 7 cepas de *Pseudomonas* inmovilizadas en piedra pómez, este trabajo tuvo procesos de optimización⁴⁸.

En otro caso se evaluó la capacidad de *Pseudomonas putida spi3* para remover tiomersal (compuesto organomercurial) de un efluente de una industria de producción de vacunas pudiendo observar que los microorganismos removieron un elevado porcentaje del compuesto. Sinha y Khare, por su parte, inmovilizaron una cepa de *Enterobacter* con capacidad para acumular Hg, para remediar un efluente industrial recolectado en la India, el cual se suplemento con 7.3 mg/L del metal, obteniéndose 100% de remoción después de 72h de cultivo. Esta bacteria fue capaz de bioacumular Hg²⁺, el cual se mantuvo confinado dentro de las células sin observar volatilización del mismo, lo que apporto la posibilidad de recuperar el mismo después del proceso de bioremediación⁴⁶.

Malakahmad y compañía utilizaron un biorreactor para tratar un efluente sintético de la industria petroquímica, que se inóculo con lodos activados conformados por una mezcla de bacterias y algas obteniéndose una eficiencia de remoción del 93% para una concentración inicial de 9 mg/L de Hg²⁺, después de 100 días de cultivo⁴⁹.

Se encuentran disponibles una diversidad de trabajos sobre bacterias con capacidad de reducir enzimáticamente el Hg orgánico e inorgánico, en la tabla 3, se muestran algunos microorganismos que se usan en la remoción de Hg.

Tabla 3. Diferentes microorganismos implicados en la remoción de Hg y compuestos derivados⁴⁵.

Microorganismo	Compuesto
<i>Pseudomonas, Psychrobacter</i>	Hg orgánico e inorgánico
<i>P. balearica</i>	MeHg
<i>P. putida V1</i>	MeHg
<i>P. fluorescens, Enterobacter cloacae, Citrobacter braakii y Alcaligenes faecalis</i>	MeHg
<i>Pseudomonas</i>	Hg ²⁺
<i>Enterobacter sp.</i>	Hg ²⁺
<i>Bacillus cereus</i>	Hg ²⁺
<i>P. putida spi3</i>	Tiomersal
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Hg ²⁺ , MeHg y etilmercurio
<i>Agaricus macrosporus</i>	Hg ²⁺
<i>Lentinus edodes</i>	Hg ²⁺

<i>Trichoderma</i>	Hg
<i>Scenedesmus, Chlorella, Oscillatoria</i>	Hg
<i>Chlamydomonas reinhardtii, Chlorella emersonii</i>	Hg ²⁺
<i>Dunaliella</i>	Hg ²⁺
<i>Kappaphycus alvarezii</i>	Hg
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> 2AMT-2 transgénica	Hg ²⁺
<i>Chlorella</i> sp. DT transgénica	Hg ²⁺

- **Utilización de hongos para la remediación de mercurio**

Ya se han descrito que existen hongos y levaduras también pueden captar metales pesados. Se ha mencionado que la captura de metales por la biomasa de hongos parece ser un proceso que involucra la acumulación y/o la bioadsorción. La superficie celular de las levaduras puede actuar como una resina de intercambio iónico, mientras que las paredes celulares de los hongos tienen un rol principal en la bioadsorción⁵⁰.

Se han hecho estudios también con la capacidad de bioadsorción de cloruro de mercurio sobre biomasa de *Phanerochaete chrysosporium*, los cuales resultaron con remoción de mercurio bastante altas de 79 y 61 mg/g de peso seco, los cuales fueron superiores a los reportados por otros microorganismos (3 – 58 mg/g de peso seco)⁵¹. Algunos autores afirman que la captación de metales pesados por hongos y levaduras, podría estar asociada con la captación y acumulación de fósforo⁵².

Igualmente se investigó la captación de metales pesados tanto en células vivas como células muertas, obteniendo diferentes resultados, ya que a la par se varían los medios de cultivo y sus condiciones. Sin embargo, los mecanismos de tolerancias en hongos todavía no están del todo establecidos.

1.5. DIAGRAMAS DE POURBAIX

Un diagrama de Pourbaix es una representación gráfica del potencial (ordenada) en función del pH (abscisa), para un metal dado bajo condiciones termodinámicas standard (usualmente agua a 25°C). El diagrama tiene en cuenta los equilibrios químicos y electroquímicos y define el dominio de estabilidad para el electrolito (normalmente agua), el metal y los compuestos relacionados, por ejemplo, óxidos, hidróxidos e hidruros.

Las líneas horizontales en el diagrama de Pourbaix (figura 8) indican reacciones con dependencia solamente del potencial, en tanto que las líneas verticales indican reacciones con dependencia solamente del pH y las líneas oblicuas indican reacciones tanto del potencial como de pH.

Los diagramas de Pourbaix se usan en el campo de la corrosión, además en campos como la electrolisis industrial, recubrimiento, electroobtención y electrorefinado de metales, tratamiento de aguas, hidrometalurgia, etc.

En la Figura 8, se muestra la construcción de un diagrama de Pourbaix para mercurio, las especies que se tomaron en cuenta son: Hg^{2+} , Hg_2^{2+} , HgOH^+ , HHgO_2^- , $\text{Hg}(\text{OH})_2$, $\text{Hg}(\text{aq})$ y $\text{HgO}(\text{s})$.

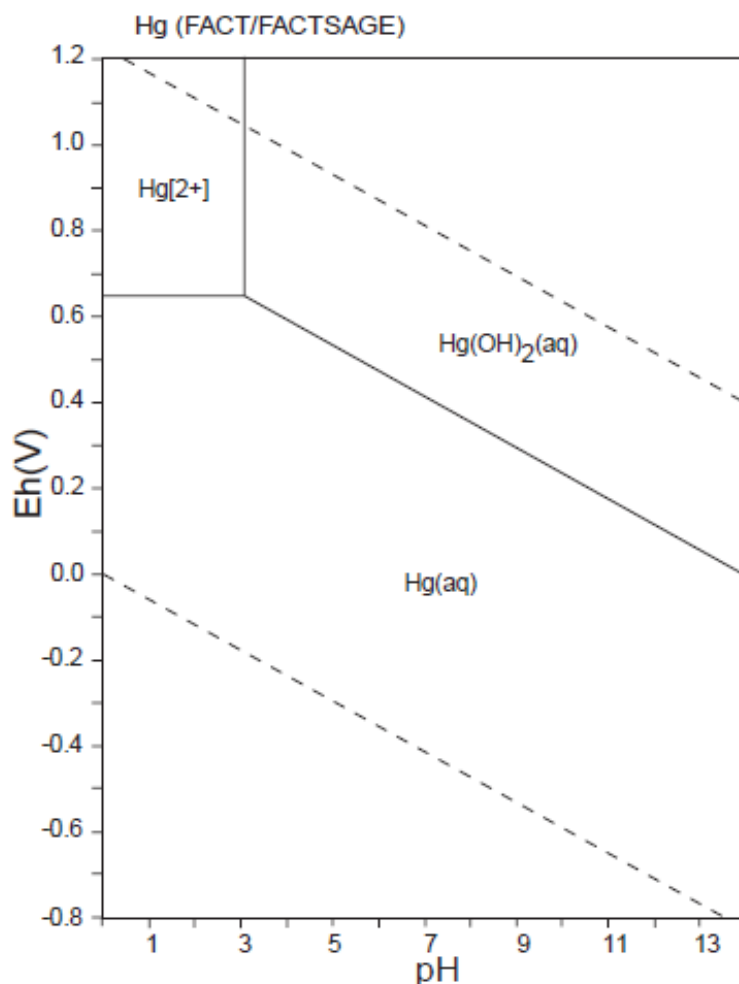


Figura 8. Diagrama de Pourbaix para mercurio, según software FACTSAGE 5.2, usando base de datos FACT⁵².

1.6. BACTERIAS

Las bacterias son microorganismos unicelulares que presentan un tamaño de algunos micrómetros de largo (entre 0.5 y 5 μm generalmente). Las bacterias son procariotas y, por lo tanto, no tienen núcleo ni orgánulos internos. Generalmente poseen una pared celular compuesta de peptidoglucanos. Muchas bacterias disponen de flagelos o de otros sistemas de desplazamiento y son móviles.

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, por lo que resultan más fáciles de mantener, crecen más rápido y pueden acumular metales pesados bajo una amplia variación de condiciones, además que tienen la capacidad de reconocer varios metales a la vez⁵³.

Dentro de ellas las que tiene un mejor comportamiento en la bioremediación de mercurio, son las *Pseudomonas*, por lo que describiremos brevemente algunas características de esta bacteria.

1.6.2. Pseudomonas

Las *Pseudomonas* son un grupo grande de bacilos Gram-negativos, rectos o ligeramente curvados, generalmente aerobios, que pueden tener flagelos polares, son oxidasa-positiva y crecen en medios de cultivo simples (figura 9).



Figura 9. *Pseudomona sp*, vista a microscopio óptico (www.biologia.laguia2000.com)

Con los recientes análisis de las secuencias de las RNAs 16S se han definido la taxonomía de muchas especies bacterianas⁵⁴. A partir de este resultado, el género *Pseudomonas* incluyen algunas cepas que fueron clasificadas anteriormente dentro de las *Chryseomonas* y *Flavimonas*⁵⁵ y otras cepas clasificadas previamente en el género *Pseudomonas*, ahora son agrupadas en otros géneros como *Burkholderia* y *Ralstonia*.

La ubicación taxonómica del género de las *Pseudomonas* podemos ver en la figura 10.

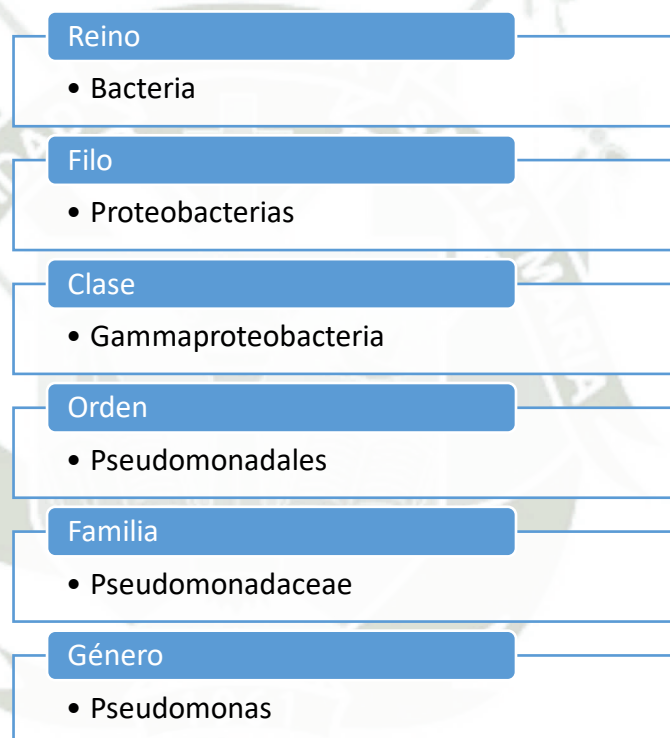


Figura 10. Taxonomía del género *Pseudomona*⁵⁶.

A partir del año 2000 se pudo determinar el genoma completo de una especie de *Pseudomonas*, posteriormente a ello se determinaron las secuencias de otras especies, incluyendo *P. aeruginosa* cepa PAO (2000), *P. putida* KT2440 (2002), *P. fluorescens* Pf-5 (2005), *P. syringae* pathovar tomato DC3000 (2003), *P. syringae* pathovar syringae B728a (2005), *P. syringae* pathovar phaseolica 1448A (2005), *P. fluorescens* PfO-1, *P. entomophila* L48 y *P. balearica* DSM 6083T (2004)⁵⁷.

La taxonomía del grupo es muy complicada y varía con frecuencia debido a avances en los estudios moleculares y ecológicos lo que supone que se han producido cambios de nombres en los últimos años.

El género *Pseudomonas* incluye a un número considerable de bacterias Gram negativas con capacidad de producir metabolitos útiles y de actuar como agentes de control biológico, así como de propensión patológica, de ahí su importancia tanto clínica como ambiental; y es, justamente estos aspectos que le dan doble reputación a este género, uno afamado y otro desacreditado⁵⁸.

La favorable reputación que tienen las *Pseudomonas* se debe básicamente a la capacidad de estos microorganismos para poder degradar una gran cantidad de compuestos orgánicos, tal como lo demuestran bastante número de publicaciones, ya que estos usan residuos orgánicos recalcitrantes que rara vez son degradados o pobremente degradados por otros grupos microbianos.

Lo que desacredita a las *Pseudomonas* es porque algunas especies tienen importancia fitopatogénica y otros son patógenos de humanos y animales. Varios tienen capacidad intrínseca de tolerancia que son codificados por genes de resistencia a antibióticos, metales pesados y agentes tóxicos.

Estas propiedades se han intensificado por el uso excesivo de antibióticos en humanos y en medicina veterinaria⁵⁹. La bacteria *Pseudomonas 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.

Las especies *Pseudomonas* son una fuente extremadamente rica en plásmidos catabólicos y de resistencia⁶⁰ lo cual aumenta el interés sobre estos microorganismos desde el punto de vista de aplicaciones biotecnológicas.

Varias especies del género de *Pseudomonas* participan activamente en el ciclo del carbono en la naturaleza, por lo que se les considera entre los organismos aerobios más versátiles en la degradación de muchos compuestos orgánicos de bajo peso molecular⁵⁸. Otros miembros del género pueden producir metabolitos de valor biotecnológico.

El mecanismo de resistencia para metales pesados, ha sido estudiado en *E. Coli* en *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosas*, de esta última se han realizado estudios realizados en muestras aisladas de lagos, plantas de tratamientos, efluentes industriales. La *Pseudomona 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.

Durante los años de 1960 se comenzó a analizar las propiedades de distintos suelos que suprimían determinadas enfermedades en plantas; algunos estudios realizados en la Universidad de California, Berkley en los años de 1970, concluyeron que algunas cepas de *Pseudomonas fluorescentes* mejoraban el crecimiento de papa y caña de azúcar cuando eran aplicadas a las semillas⁶¹, esto conllevó a la investigación sobre el uso de inoculantes bacterianos para controlar patógenos y mejorar el crecimiento vegetal. Esto se conoció como control biológico y es utilizado como una alternativa ecológica al uso de pesticidas sintéticos.

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.

Como ya mencionamos se han realizado muchos estudios que demuestran que las cepas de *Pseudomonas sp*, contienen en su genoma genes que le confieren a capacidad de reducir el mercurio (Hg)²⁺, por lo que se considera una bacteria con un alto potencial biotecnológico para la detección y reducción del mercurio a formas menos tóxicas³.

1.7. CINÉTICA MICROBIANA

El crecimiento microbiano se define como el aumento del número de células como consecuencia de un crecimiento individual y posterior división, se estudia analizando la

curva de crecimiento de un cultivo microbiano, que representa la evolución del número de células viables, presente en un cultivo microbiano líquido a lo largo de un tiempo específico.

Se estudia el número de células viables por mililitro de un cultivo de volumen limitado y con una cantidad de nutrientes limitada, en consecuencia, las concentraciones de nutrientes disminuyen y la de residuos aumenta.

En la curva de crecimiento microbiano, podemos diferenciar 4 fases, la fase de latencia, que es la fase de adaptación microbiana que es recién inoculada al medio de cultivo líquido. Después tenemos la fase de crecimiento exponencial o logarítmica, en donde los microorganismos crecen y se dividen hasta el nivel máximo posible.

Posteriormente viene la fase estacionaria, en donde el crecimiento de la población cesa y la curva de crecimiento se vuelve horizontal, donde alcanza el máximo crecimiento microbiano y por último se presenta la fase de muerte celular, en donde la cantidad de células viables desciende como consecuencia de la reducción de nutrientes y la acumulación de residuos tóxicos, estas fases las observamos en la figura 11.

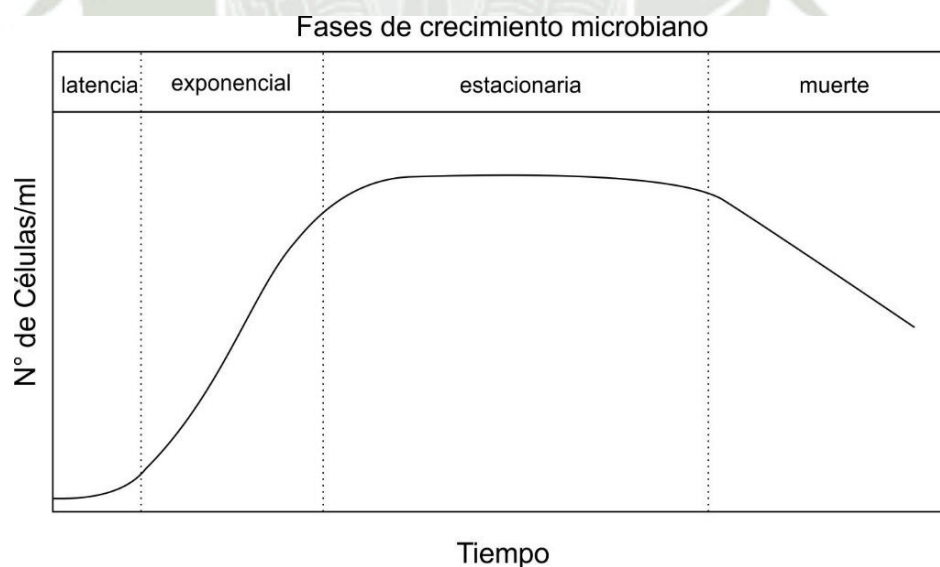


Figura 11. Modelo de curva de crecimiento microbiano⁶².

La velocidad de crecimiento exponencial se expresa como el tiempo de generación (g) o de duplicación.

Para lo cual se debe tener en cuenta las siguientes consideraciones: que la curva de crecimiento bacteriano resulta de la representación gráfica del número de células por mililitro que existen en un líquido inoculado con células microbianas provenientes de un cultivo que ha crecido previamente hasta la saturación⁶².

Por lo tanto, el crecimiento celular puede considerarse como una reacción autocatalítica de primer orden, en donde el crecimiento es el único proceso que afecta la concentración celular en un sistema cerrado.

Donde tenemos la siguiente ecuación 1:

$$N = N_0 e^{\mu t} \quad (1)$$

Dónde:

μ : constante específica de crecimiento (T^{-1})

N: concentración final de células viables ($Kg \cdot m^{-3}$)

N_0 : concentración inicial de células viables. ($Kg \cdot m^{-3}$) a tiempo cero.

t: tiempo (hrs).

Si realizamos una transformación neperiana a la ecuación 2, obtendremos la ecuación que representa el crecimiento exponencial.

$$\ln N = \ln N_0 + \mu t \quad (2)$$

De acuerdo a la ecuación, esta puede ser representada gráficamente, en donde $\ln N$ y $\ln N_0$, es representado por el eje Y ($\ln N^\circ$ de cel/mL), t es el tiempo en horas y en donde μ es representando por la pendiente de la línea recta.

La velocidad de crecimiento bacteriano, mencionamos que se expresa en términos de tiempo de generación, el cual está representada por la ecuación 3:

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (3)$$

Cabe recordar que este método solo se utiliza para determinar si la velocidad de crecimiento específica es constante. Sabiendo que es válido únicamente si μ no varía, es decir solo en fase exponencial⁶³.

Un método para realizar el conteo celular, es mediante el conteo en cámara de Neubauer; éste es un portaobjetos de conteo para su uso en el microscopio óptico (figura 12), con una depresión central en el fondo de la laminilla, en la que se ha marcado una retícula micrométrica. Es un cuadrado de 3mm x 3mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0.25mm, por lo que el área central corresponde a 1mm².

La depresión central del cubreobjetos está hundida 0.1mm respecto a la superficie, de forma que, cuando se coloca el cubreobjetos, este dista de la superficie marcada 0.1mm y el volumen comprendido entre la laminilla y el área reticulada es de 0.1mm³.

El área central está dividida por 5 cuadrantes y estos a su vez por 4 pequeños cuadrados, los cuadrantes exteriores del área rayada son de 1mm² y se dividen en 16 cuadrados.

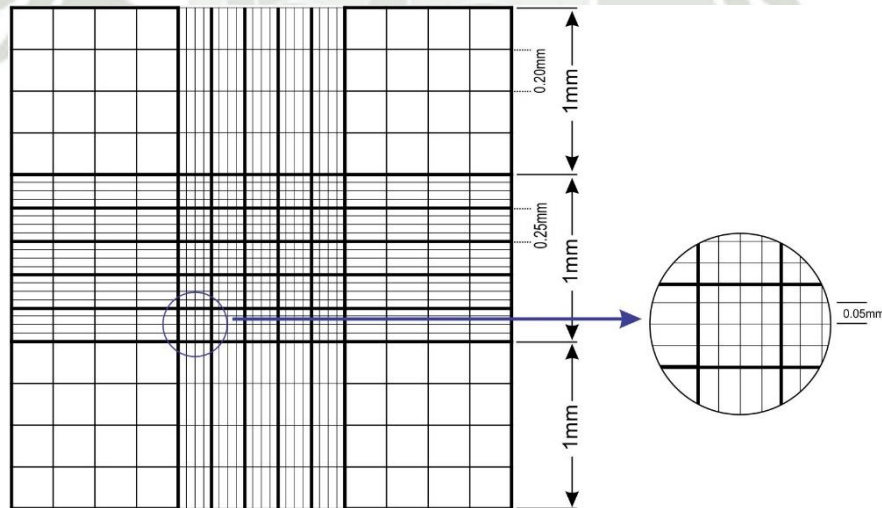


Figura 12. Cuadrícula de cámara de Neubauer⁶³.

Cuando se realiza el conteo en caso de bacterias en el área central, se aplica la siguiente fórmula para obtener el número de células por mililitro presentes en el medio de cultivo.

$$N = NCC \times 25 \times 10 \times 1000 \quad (4)$$

Dónde:

- N: Número de células por mililitro.
- NCC: Número de células promedio contadas en la cámara de Neubauer.
- 25: Número de cuadrados presentes en el cuadrante central.
- 10: Factor de corrección para llevar la cuenta a 1 milímetro cubico.
- 1000: Factor de corrección para llevar la cuenta a 1 mililitro.

1.7.2. Microbiología Predictiva

La microbiología predictiva, es el conocimiento detallado de las respuestas microbianas a determinadas condiciones ambientales, el cual permite una evaluación objetiva del efecto de los parámetros de procesamiento y almacenamiento sobre la calidad y seguridad⁶⁴. Esto se basa en la modelación matemática para describir el comportamiento microbiano y posteriormente predecir el crecimiento con el apoyo de esta técnica. Los modelos de predicción permiten interpolar entre los puntos de datos experimentales, ayudando a predecir respuestas para condiciones no estudiadas⁶⁵.

La base del crecimiento de los microorganismos está en función del medio que le rodea. Los factores determinantes que predominan en el crecimiento de microorganismo son el pH, actividad de agua, temperatura y, en este sentido es que se desarrolla la microbiología predictiva. Existen varios modelos para predecir el crecimiento biológico, entre ellos están el modelo Brody, VonBertalanffy, Richards, logístico, Gompertz. Estos modelos son funciones no lineales.

1.7.3. Modelo Logístico

Expresamos un modelo de crecimiento bacteriano de tipo logístico, este modelo es un modelo primario el cual determina la cantidad de población en función del tiempo, el cual es descrito por un conjunto de parámetros como: valor máximo de crecimiento, velocidad de crecimiento, tiempo de latencia⁶⁶. Este modelo esta descrito en la ecuación 5, el cual está adaptado para este tipo de crecimientos microbianos.

$$Y = \frac{z}{1 + e^{\frac{-\ln 81}{a} * (t-b)}} \quad (5)$$

En donde:

Y: Concentración bacteriana, (cel/mL)

z: Punto de saturación bacteriana (cel/mL).

a: Velocidad de crecimiento (hrs)

t: Tiempo de crecimiento (hrs)

b: Punto de inflexión de la curva (hrs)

En donde a, b y z son parámetros que deben determinarse.

1.8. IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

El aislamiento y la identificación de microorganismo presentes en un ambiente natural es el primer paso de una investigación para determinar las propiedades y características particulares de los diferentes géneros presentes y los metabolitos o enzimas extracelulares que pueden producir⁶⁷.

1.8.2. Identificación morfológica

Las pruebas bioquímicas permiten determinar las características metabólicas de las bacterias las cuales son objeto de identificación.

Algunas de estas pruebas son técnicas rápidas, ya que evalúan la presencia de una enzima preformada y su lectura puede variar entre algunos segundos hasta unas pocas horas. Otras pruebas requieren para su lectura el crecimiento del microorganismo con una incubación previa de 18 a 48h; a este grupo pertenecen la mayoría de las pruebas que detectan componentes metabólicos o aquellas que determinan la sensibilidad de un microorganismo a una sustancia dada tras cultivo en medios de identificación que contienen el sustrato a metabolizar específico. No obstante, algunas de estas pruebas pueden realizarse de forma rápida tras incubación de unas 2-6h; en general, se trata de reacciones enzimáticas cromogénicas o pruebas convencionales modificadas (hay discos o tabletas comercializados con sustratos cromogénicos para uso individualizado)⁶⁸.

I. Tinción Gram

La tinción de GRAM, es una tinción diferencial que permite la clasificación de las bacterias en base a su forma, tamaño, morfología celular y reacción GRAM (color), de

acuerdo a la reacción Gram, las bacterias se clasifican en dos grupos: Gram+ y Gram-⁶⁹. El distinto comportamiento en la tinción se debe a las diferentes capas superficiales o paredes de los dos tipos de bacterias⁶⁹.

En el proceso de tinción se emplean 4 tipos de soluciones:

- El cristal violeta que es un colorante básico.
- Lugol, que sirve para potenciar o reforzar la acción del cristal violeta.
- Alcohol, que sirve para decolorar las células que están teñidas.
- Solución de contraste (fucsina, safranina) que es la que va diferenciar el color final⁶⁹.

Los microorganismos no se decoloran fácilmente, sino que retienen el color del colorante inicial (básico), las células que retienen este colorante básico inicial, son las que se van a quedar teñidas de color violeta, mientras que las demás van a quedar de color rojizo⁷⁰.

Esto se debe a la diferencia en su pared celular, básicamente hay dos causas de diferencia: la cantidad de fosfolípidos que tienen las Gram-, el cual es mayor que el de las Gram + y, por otro lado, los peptidoglucanos, que es mayor en las Gram + que en las Gram -⁷⁰.

El alcohol en las Gram - va a extraer los lípidos de la pared con lo cual aumentan los poros de esa pared y sale el colorante de cristal violeta. En las Gram +, que tienen menos lípidos, ocurre una deshidratación de la pared y por lo tanto disminuyen los poros de la pared, entonces no sale el cristal violeta⁷⁰.

La safranina es un colorante de contraste, las Gram - van a quedar teñidas de color rojo o rojizo y las Gram + quedarán de color azul (violeta)⁷⁰. Las Gram -, tienen una gran cantidad de lípidos en su pared, el alcohol los extrae, origina grandes poros en su pared y a través de ellos el complejo cristal violeta - yodo, puede salir permitiendo que su lugar sea ocupado por el colorante fucsina, tomando por tanto un color entre rojo y rosado⁶⁹. En las Gram+, al actuar el alcohol se produce deshidratación y los poros de la pared disminuyen, el complejo cristal violeta - yodo no puede salir y las células quedan teñidas de color púrpura - violeta⁶⁹.

La tinción de Gram constituye una prueba de primera línea muy útil para detectar e identificar bacterias y algunos hongos. Sin embargo, los resultados obtenidos deben completarse con otras pruebas adicionales. Así, para confirmar el diagnóstico, son necesarias pruebas como cultivos, pruebas de detección de antígenos o de anticuerpos, o pruebas moleculares.

1.8.3. Identificación bioquímica

I. Catalasa

La catalasa es una enzima bacteriana que desdobla el agua oxigenada en agua y oxígeno. Constituye un sistema de defensa bacteriano frente a agentes hiperoxidantes como el peróxido de hidrógeno o agua oxigenada⁷¹.

La catalasa se encuentra en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas que contienen citocromos. Por lo general los organismos que no poseen el sistema citocromo carecen de esta enzima y por lo tanto no pueden descomponer el peróxido de hidrógeno. La mayoría de las bacterias anaerobias no poseen la enzima catalasa, pero en su reemplazo poseen una enzima flavoproteínica NADH₂ peroxidasa, que también cumple la función de descomponer el peróxido de hidrógeno, produciendo agua solamente.

II. Oxidasa

Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo que es reducido por el oxígeno molecular que produce agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana.

Durante la prueba la enzima oxidasa en presencia de oxígeno, citocromo C y el reactivo de la oxidasa, este se oxida para producir un compuesto colorido llamado indofenol, el reactivo más usado es el reactivo de Kovacs oxidasa, que es una solución de tetrametil-p-fenilendiamina al 1%.

El oxígeno actúa por tanto como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones. Por lo general, el sistema citocromo-oxidasa sólo se encuentra en los organismos aerobios, algunos anaerobios facultativos y, excepcionalmente, en algún microaerófilo (*Vibrio fetus*), pero los anaerobios estrictos carecen de actividad oxidasa. Así mismo, la presencia de oxidasa va ligada a la producción de catalasa, ya que ésta degrada el peróxido de hidrógeno que se produce como consecuencia de la reducción del oxígeno y cuya acumulación es tóxica.

III. Agar TSI (triple azúcar hierro)

El agar TSI, es un medio de cultivo sólido, sirve para fundamentar la evidencia de fermentación de azúcares presentes como glucosa, sacarosa, lactosa. También permite la identificación de la producción de S_2H . Cuando dichos carbohidratos se fermentan, la producción resultante de ácido es detectada por el indicador rojo fenol. Se producen cambios de color: amarillo para la producción de ácido y rojo para la alcalinización⁷².

Cuando el microorganismo es incapaz de fermentar la glucosa presente en el medio, indica que puede excluirse de pertenecer a la familia de las Enterobacterias, es por eso que esta prueba es esencial para decidir la ruta que se debe de tomar para identificar el género y la especie en estudio.

La interpretación de la prueba divide a los microorganismos en 3 categorías: no fermentadores de glucosa, no fermentadores de lactosa y fermentadores de lactosa/sacarosa.

Si el microorganismo inoculado no es capaz de fermentar la glucosa, tampoco podrá fermentar otros carbohidratos, razón por la cual, no se formarán ácidos, pero existirá formación de aminas en el bisel por la utilización de peptonas, por tal motivo, el tubo puede quedar todo rojo.

IV. Agar LIA (Lisina- Hierro-Agar)

Es utilizado para la diferenciación de microorganismos entéricos en base a su capacidad para desaminar o descarboxilar la lisina y de producir sulfuro de hidrógeno. Este medio también es conocido como LIA, Edwards y Fife desarrollaron este medio para diferenciar a *Salmonella arizonae*. Debido a que *S. arizonae* fermenta la lactosa

rápidamente, la producción de H_2S es suprimida en el Agar de Hierro y Triple Azúcar. Eliminando la lactosa e incorporando la lisina, Edwards y Fife encontraron que este medio diferencia a los bacilos entéricos en base a su capacidad para descarboxilar o desaminar la lisina y producir H_2S .

En el medio de cultivo, la peptona y el extracto de levadura aportan los nutrientes para el desarrollo bacteriano. La glucosa es el hidrato de carbono fermentable, y la lisina es el sustrato utilizado para detectar la presencia de las enzimas descarboxilasa y desaminasa. El citrato de hierro y amonio, y el tiosulfato de sodio, son los indicadores de la producción de ácido sulfhídrico. El purpura de bromocresol, es el indicador de pH, el cual es de color amarillo a pH igual o menor a 5.2, y de color violeta a pH igual o mayor a 6.8. Por descarboxilación de la lisina, se produce la amina cadaverina, que alcaliniza el medio y esto produce el viraje del indicador al color violeta.

La descarboxilación de la lisina, tiene lugar en medio ácido, por lo que es necesario que la glucosa sea previamente fermentada. Los microorganismos que no producen lisina descarboxilasa, pero que son fermentadores de la glucosa, producen un viraje de la totalidad del medio de cultivo al amarillo, pero a las 24h de incubación se observa el pico de color violeta debido al consumo de las peptonas, y el fondo amarillo. La producción de sulfuro de hidrógeno, se visualiza por el ennegrecimiento del medio debido a la formación de sulfuro de hierro.

Las cepas de los géneros *Proteus*, *Providencia* y algunas cepas de *Morganella*, desaminan la lisina, esto produce un ácido alfa-ceto-carbónico, el cual, con la sal de hierro y bajo la influencia del oxígeno forma un color rojizo en la superficie del medio.

V. Agar Citrato de Simmons

El citrato de sodio es una sal del ácido cítrico, un compuesto orgánico simple que constituye uno de los metabolitos del ciclo de los ácidos tricarbónicos. Generalmente los microorganismos que emplean el citrato como única fuente de carbono, utilizan sales de amonio como única fuente de nitrógeno. El metabolismo del citrato realizado, por algunas bacterias se realiza por el ciclo de Krebs y requiere el desdoblamiento del citrato

por la enzima citritasa (citrato-oxalacetato-liasa o citrato desmolasa) en presencia de magnesio o manganeso y de transportadores como citrato permeasas.

La citritasa actúa sobre el citrato produciendo ácido oxalacético y acetato; productos que son convertidos enzimáticamente a piruvato y dióxido de carbono. Durante esta reacción el medio comienza a alcalinizarse por el CO₂ que se genera, el cual se combina con el agua y el sodio para formar carbonato un producto alcalino, este carbonato da la alcalinidad que produce el cambio de color del indicador de pH del medio de verde a azul Prusia oscuro (indicador: azul de bromo timol, amarillo a pH < de 6.0 y azul a pH > de 7.6). El medio incluye citrato como única fuente de carbono y fosfato de amonio como única fuente de nitrógeno⁷³.

VI. Agar Urea

El agar urea es un medio sólido diferencial para microorganismos, en especial los miembros de la especie *Enterobacteriaceae*, según su capacidad de producir ureasa.

Christensen fue quien orientó los primeros trabajos en busca de un medio que permitiera la detección de bacterias capaces de descomponer la urea. Realiza la diferenciación entre organismos proteas rápidos positivos a la ureasa y otros organismos positivos a la ureasa: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*. Ureasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de urea a dióxido de carbono y amoníaco *Enterobacteriaceae*: es una familia de bacterias Gram negativas que contiene más de 30 géneros y más de 100 especies que pueden tener morfología de bacilos o cocos.

Este medio es menos tamponado que el Caldo Urea además tiene componentes nutritivos y energéticos, lo que permite un crecimiento más diversificado de microorganismos y una detección más amplia de ureasa positivos. Cuando los organismos utilizan urea, se produce amoníaco durante la incubación, lo que hace la reacción de dichos medios alcalina y genera un color rosa rojo. En consecuencia, la producción de ureasa puede detectarse mediante el cambio en el indicador rojo fenol⁷⁴.

VII. Agar Cetrimide

Medio utilizado para el aislamiento selectivo de *Pseudomona aeruginosa* y de otras especies del género. Su formulación estimula la formación de pigmentos. Es este un

medio muy semejante al King A, en el cual la peptona de gelatina aporta los nutrientes para el desarrollo microbiano. El cloruro de magnesio y el sulfato de potasio promueven la formación de piocianina, pioverdina, piomelanina y fluorescencia en *P. aeruginosa*. La cetrimida es un detergente catiónico que actúa como agente inhibidor, libera el nitrógeno y el fosforo de las células de casi toda la flora acompañante, aunque inhibe también algunas especies de *Pseudomonas*⁷⁵.

1.8.4. Identificación molecular

La PCR-DGGE, es utilizada para determinar la composición bacteriana y la diversidad presentes en cualquier medio, nos permite determinarla de manera más precisa, con la ayuda de primers específicos, La capacidad del DGGE nos proporciona una imagen visual directa de la diversidad bacteriana en la muestra.

Secuencia del ARNr 16S

Los ribosomas son los lugares de la síntesis protéica y se encuentran por tanto en todas las células^{69,76}. Desde el punto de vista de su función son muy conservativos, esto es especialmente válido para los RNA ribosómicos (RNAr) ya que su secuencia de bases no está influida por la degeneración del código genético ni por mutaciones supresoras, el ARNr cumple por lo tanto las condiciones que debe tener un marcador filogenético general. Para ello se han aislado los ARNr 16S de las subunidades menores de los ribosomas de los organismos que se quieren comparar⁶⁹. El ARNr 16S es un polirribonucleótido de aproximadamente 1500 bp codificado por el gen *rrs*, también denominado ADN ribosomal 16S (ADNr 16S), a partir de cuya secuencia se puede obtener información filogenética y taxonómica. En eucariotas el ARNr 18S es la macromolécula equivalente. Éstos polirribonucleótidos se encuentran altamente conservados, presentando regiones comunes a todos los organismos, pero contienen además variaciones que se concentran en zonas específicas⁷⁶. El análisis de la secuencia de los ARNr 16S de distintos grupos filogenéticos presenta una o más secuencias características que se denominan oligonucleótidos firma, los cuales se tratan de secuencias específicas cortas que aparecen en todos o en la mayor parte de los miembros de un determinado grupo filogenético, nunca o sólo raramente están presentes en otros grupos, por ello los oligonucleótidos firma pueden utilizarse para ubicar a cada bacteria dentro de su propio grupo⁷⁶. El ARNr 16S es considerado como cronómetro

molecular definitivo debido a que: Es una molécula muy antigua presente en todas las bacterias actuales, constituyendo una diana universal para su identificación.

Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado, de modo que las alteraciones en la secuencia reflejan probablemente cambios aleatorios⁷⁶.

Los cambios ocurren de manera suficientemente lenta, como para aportar información acerca de todos los procariotas⁷⁶.

El tamaño relativamente largo minimiza las fluctuaciones estadísticas. Su secuencia permite la identificación de regiones de homología y heterogeneidad⁷⁶. Su tasa de cambio de la secuencia está en correlación con la distancia evolutiva⁷⁶. Las técnicas moleculares basadas en la detección específica de secuencias de ácidos nucleicos, han permitido, por una parte, incrementar notoriamente la capacidad de detección de microorganismos, evitando generalmente los pasos de aislamiento y cultivo, mientras que por otra hayan refinado las posibilidades de identificación y tipificación para bacterias cultivadas. Dentro de la caracterización molecular de bacterias, la secuenciación y el análisis del gen 16S que codifica el ARN ribosómico es la técnica de identificación más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía del mundo procariota, causando un profundo impacto en nuestra visión de la evolución, y como consecuencia, en la clasificación e identificación bacteriana⁷⁶.

Para la identificación bacteriana existen diversas herramientas bioinformáticas tales como Blast server for bacterial identification, la cual permite la exploración en una base de datos teniendo en cuenta secuencias de al menos 1200 nucleótidos, tiene gran sensibilidad a secuencias con débil similitud, otra de ellas es Ribosomal database Project, la cual organiza secuencias en bruto de las alineaciones, anota los datos de las secuencias de RNAr y ofrece un panorama filogenético; por otro lado; BIBI database identifica la secuencia teniendo en cuenta el porcentaje de similitud, la longitud de la secuencia y la menor distancia filogenética. El análisis comparativo de secuencias permite construir árboles filogenéticos que reflejan gráficamente la genealogía molecular de la bacteria, mostrando su posición evolutiva en el contexto de los organismos comparados⁶⁹.

1.9. IDENTIFICACION BACTERIA MEDIANTE BIOINFORMATICA

1.9.2. Análisis bioinformático de secuencias

En el análisis bioinformático, las secuencias obtenidas por secuenciación, son alineadas y comparadas con las secuencias depositadas en la base de datos disponibles.

El alineamiento es una herramienta cualitativa que permite dar los primeros pasos hacia la conclusión de que dos o más secuencias son homólogas y consiste en hacer coincidir las secuencias en aquellas regiones en las que se repitan el mayor número de monómeros (caracteres) posibles. Esta técnica aparentemente sencilla se hace más compleja en la medida en que el tamaño de las secuencias a comparar es mayor y más aún cuando se comparan más de dos secuencias⁷⁷.

1.9.3. Bases de datos

Los proyectos de secuenciamiento de genomas de organismos biológicos como el del Genoma Humano, han generado una inmensa cantidad de información de secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos. Estas bases de datos son esfuerzos coordinados que intentan en lo posible almacenar información de manera no redundante. Podemos encontrar principalmente dos bases de datos de este tipo en el mundo, para secuencias de ADN: El Genbank en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) de los Estados Unidos y el EMBL (European Molecular Biology Laboratory) en el European Bioinformatics Institute⁷⁸.

1.9.4. Análisis filogenético molecular

Los sistemas biológicos evolucionan continuamente, es decir, van cambiando a lo largo del tiempo. Estos cambios que pueden ser mutaciones, deleciones, inserciones, etc., se producen en el ADN de un modo más o menos aleatorio y se manifiestan a distintos niveles: proteínas, células, organismos, etc. La interacción con el medio determina cuales de estos cambios son aceptados y cuáles no⁷⁹.

Cuando hablamos de una filogenia nos referimos a una hipótesis acerca de la historia. Es una hipótesis porque nunca estaremos seguros de que ha ocurrido exactamente. El objetivo

de los métodos de reconstrucción filogenética es utilizar del mejor modo posible la información actual para hacer inferencia acerca del pasado, es decir, para obtener hipótesis que sean lo más fiables posibles⁸⁰.

Las hipótesis resultantes normalmente se expresan en forma de un árbol, en el que la topología nos habla de las relaciones de parentesco entre las distintas entidades (genes o especies) y la longitud de las ramas del árbol de la distancia que hay entre ellas.

Un árbol filogenético es una especie de diagrama en el que los nodos externos se corresponden con las entidades que estamos estudiando (por ejemplo, las secuencias de DNA) y los nodos internos que se refieren a los ancestros de estas. Un árbol filogenético puede tener raíz o no tenerla, si hay una raíz también habrá un nodo raíz que corresponderá con el ancestro común de todos los nodos externos.

Existen dos tipos de métodos de reconstrucción filogenética:

- Los basados en distancias.
- Los basados en caracteres⁸⁰.

Los primeros, resumen la información de un alineamiento múltiple en una matriz de distancias entre secuencias. Quiere decir, que utilizan el alineamiento para calcular la distancia entre las secuencias, posteriormente tratan de reconstruir el árbol evolutivo a partir de dichas distancias.

Por su parte, los métodos basados en caracteres, hacen uso de la información de cada columna (sitio, posición) del alineamiento múltiple para inferir la mejor hipótesis.

I. Métodos basados en distancias

- **UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic means)**

El método de UPGMA es el más sencillo de todos. Es un algoritmo de clustering o agrupamiento de abajo a arriba o bottom-up. El algoritmo recibe una matriz de distancias y a partir de ella genera un árbol filogenético. Inicialmente cada entidad de la matriz tiene su propio grupo (=cluster). De forma recursiva, en cada paso se

unen los dos grupos más cercanos y se recalculan las distancias, definiéndose la distancia entre dos grupos como la media (sin ponderar) de las distancias que hay entre los miembros de cada grupo, de ahí el nombre de “UPGMA”.

- **Neighbor Joining**

El método de Neighbor Joining (NJ) es también un algoritmo de agrupamiento de abajo a arriba, pero en este caso no se asume la existencia de un reloj molecular. Se basa en el principio de evolución mínima: una vez definida la matriz de distancias entre las secuencias, el principio dice que el mejor árbol es aquél que minimiza la longitud del árbol (=suma de las longitudes de todas las ramas). El método de NJ aplica una heurística para tratar de encontrar dicho árbol. Es un método greedy, es decir, supone que, si se minimiza en cada paso la longitud del árbol, se minimizará la longitud global, lo cual no siempre es cierto, pero sí frecuentemente⁸⁰.

II. Métodos basados en caracteres

- **Máxima parsimonia**

El método de máxima parsimonia (MP) es un método basado en caracteres y por tanto trata de utilizar cada una de las posiciones del alineamiento múltiple (AM) como una pista en la búsqueda del árbol más probable. Se basa en el principio de la navaja de Occam: la hipótesis más sencilla es la más probable. En términos de secuencias, el árbol más probable (más parsimonioso) es aquél en el que el número de cambios es menor (similar al principio de evolución mínima).

- **Máxima verosimilitud**

El método de máxima verosimilitud (ML, Maximum Likelihood) pertenece a la categoría de métodos estadísticos. A diferencia del método de MP, el de ML requiere un modelo de evolución (ver más adelante) para el cálculo de probabilidades. Un modelo de evolución proporciona información del tipo: cuán probable es cada uno de los reemplazamientos de amino ácidos posibles. La idea del método de ML no es calcular la probabilidad de la hipótesis (árbol) en función de los datos, sino encontrar la probabilidad de que, a partir de un árbol y un modelo de evolución dados, se hayan generado los datos (=el alineamiento múltiple): $P(D|H)$. En general, no sólo en inferencia filogenética, el método de ML se utiliza para hacer inferencias acerca de

los parámetros que han dado lugar a una distribución de probabilidad (o un conjunto de datos).

- **Métodos bayesianos**

Si el método de ML encontraba el árbol que con mayor probabilidad había generado los datos, el método bayesiano (MB) determina para cada árbol, la probabilidad de que sea la hipótesis correcta (en función de los datos). A la probabilidad de cada árbol dados unos datos, $P(H|D)$, se denomina probabilidad posterior porque se calcula la probabilidad de una hipótesis a partir de los resultados que produciría dicha hipótesis.

Por alguna razón matemática, no existe una solución analítica al sistema de Bayes en el problema de inferencia filogenética. No obstante, existe una aproximación para estimar la distribución de probabilidad posterior (i.e. la probabilidad de cada árbol): el Markov Chain Monte Carlo (MCMC). La idea es la siguiente: se inicializan al azar los parámetros que queremos inferir (topología, long ramas, parámetros modelo evolutivo). Seguidamente se hace un pequeño movimiento aleatorio (modificación de los parámetros) y se evalúa la función de probabilidad. Si los valores mejoran, entonces se acepta el movimiento y se repite el proceso. Si no mejoran, el nuevo estado se acepta con una probabilidad proporcional al empeoramiento producido. La idea es que si repetimos este proceso muchas veces (p.e. 1.000.000) obtendremos una estimación de la probabilidad asociada a cada estado (a cada árbol)⁸⁰.

1.10. TECNICAS DE INMOVILIZACION CELULAR

En los últimos años la biotecnología ha tenido importantes avances en su aplicación en procesos industriales para la obtención de productos químicos, alimentarios y farmacéuticos, así como en el área ambiental. Las técnicas de inmovilización se aplican tanto a las células como a los microorganismos y las enzimas. La principal ventaja es facilitar la separación del producto y permitir la recuperación del agente biológico.

La inmovilización celular es un proceso en el que se puede confinar o localizar una célula en una determinada región definida del espacio, para dar lugar a formas insolubles que retienen su actividad catalítica y que pueden ser reutilizadas en repetidas veces⁸¹.

La inmovilización celular comenzó en los años 70, durante este tiempo de estudio se pudo establecer que el uso de células inmovilizadas en lugar de aquellas cultivadas en un proceso intermitente normal tiene las siguientes ventajas:

- Las fermentaciones en lotes pueden reemplazar por reacciones continuas.
- Las células inmovilizadas permiten el uso de una densidad celular considerablemente mayor, con lo que se logra una mayor eficacia del proceso⁸².

La inmovilización de células, es una técnica atractiva para fijar y retener biomasa en materiales sintéticos o naturales, bajo un rango de condiciones de operación físicas y bioquímicas. Las ventajas de esta técnica incluyen la retención de biomasa en el ambiente de trabajo, fácil separación de productos desde la célula y una alta densidad celular local⁸³. Existen criterios para seleccionar algún método de inmovilización celular, y esto depende de determinadas características como:

- Debe ser seguro. El enorme costo para la determinación de la seguridad de un producto significa que se debe evitar la utilización de reactivos químicos peligrosos.
- El proceso no debe ser complicado, puesto que el uso de soportes caros y procedimientos largos aumentara los costos del proceso.
- Debe ser suave con la finalidad de mantener la viabilidad celular, la integridad de la membrana o la actividad enzimática.
- La actividad celular se debe mantener tanto como sea posible, se debe evitar la pérdida por fugas de células como para provocar restricciones difusionales⁸⁴.

Se han descrito varios métodos y soportes para la inmovilización de bacterias, pero la que suele tener mejores referencias es el atrapamiento físico en matrices poliméricas las cuales han tenido éxito. Se han estudiado una amplia gama de soportes (orgánicos e inorgánicos) para la mejor inmovilización de células de *Pseudomonas*⁸⁵.

Las aplicaciones de la biotecnología para poder resolver problemas ambientales han permitido el desarrollo de diversas técnicas de bioremediación para suelos y aguas contaminadas, cuando se usa células inmovilizadas en procesos de remoción de contaminantes se logra incrementar la tasa global de biodegradación, debido a las altas

densidades celulares que se alcanzan, además de incrementar la estabilidad y tolerancia de los microorganismos a los compuestos tóxicos^{86,87}.

1.10.2. Atrapamiento celular

El atrapamiento de células en una red tridimensional de polímero es un método bastante popular. Se utiliza poliacrilamida, poliuretano, colágeno, gelatina, agarosa, alginato de calcio, quitosano y k-carragenina como materiales para la formación de la matriz. Otros materiales comúnmente usados como soporte para la inmovilización son los residuos lignocelulósicos, cuya ventaja adicional radica en la producción de azúcares durante su hidrólisis, lo que a su vez minimiza la generación de desechos⁸⁹.

El alginato es un polímero que ha sido usado extensivamente en estudios de inmovilización celular. Entre las ventajas para usarlo se incluye su fácil preparación, biocompatibilidad y capacidad para retener células por atrapamiento en una matriz de finos poros, además es un sistema seguro y simple que ofrece un esfuerzo mecánico adecuado^{89,90}.

Roig, Pedraz y Sánchez evaluaron algunas técnicas de inmovilización mediante el crecimiento de biopelículas, atrapamiento físico de células y su unión química sobre soportes inorgánicos. Además; comprobaron que la espuma reticulada de poliuretano proporciona una elevada capacidad de carga celular, actividad biodegradativa satisfactoria, así como una estabilidad operacional durante el funcionamiento del biorreactor⁹¹.

La cinética de biodegradación de contaminantes por células inmovilizadas, tal como sucede en cultivos con células libres, es afectada por el pH, la temperatura y la concentración inicial del contaminante, pero los límites de tolerancia son mayores cuando los microorganismos están inmovilizados^{92,93}.

No es muy bien conocido el mecanismo por el cual los microorganismos se unen a superficies sólidas produciendo una delgada biopelícula, aparentemente estas secretan macromoléculas que inician en la interacción microorganismo-superficie y este es el caso de las *Pseudomonas*, que crecen fácilmente como biopelícula unida a soporte sólido⁸⁵.

Algunos estudios demuestran la eficacia en la inmovilización de *Pseudomonas*; por ejemplo, algunas fueron inmovilizadas en fibras de algodón para degradar benceno, tolueno y etilbenceno, logrando altas velocidades de degradación⁹⁴. Otro caso de estudio fue la inmovilización de *Pseudomonas fluorescens* en zeolita, para la degradación de aguas de desecho contaminadas con cianuro provenientes de la industria del acero, obteniendo buenos resultados⁹⁵. En la tabla 4 se muestran algunos microorganismos que fueron inmovilizados por atrapamiento.

Tabla 4. Microorganismos inmovilizados por atrapamiento⁸⁴.

Método	Organismo	Producto
Poliacrilamida	<i>E. coli</i>	β -lactamasa
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Etanol
Poliuretano	<i>Capsicum frutescens</i>	Capsaicina
	<i>Aspergillus niger</i>	Ácido cítrico
Agar, agarosa	<i>E. coli</i>	Hidrólisis de lactosa
	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	Sucrosa
	<i>Methylomonas</i>	Oxidación de metano
Alginato	<i>Arthobacter simplex</i>	Pedrisolona
	<i>Curvularia</i>	Cortisona
	<i>Gluconobacter oxidans</i>	Dihidroxiacetona
K- carregenano	<i>Acetobacter oxidans</i>	L-sorbosa
	<i>Bacillus amyloliquifaciens</i>	α -amilasa
	<i>Penicillium</i>	Patulina

La técnica de atrapamiento celular en alginato de sodio, es relativamente simple. Se disuelve el alginato de sodio en un poco de agua caliente, se mezcla bien, y cuando ya se encuentre frío se agregan los microorganismos. Se deja caer la mezcla final, gota a gota, en una solución de cloruro de calcio. Con el intercambio de iones de calcio (del medio) y sodio (del alginato) se forma una matriz de alginato de calcio que retiene los microorganismos.

A pesar de tener una consistencia sólida, dicha matriz permite la circulación de sustancias, de modo que los agentes biológicos conservan su actividad metabólica. Una vez finalizadas

las reacciones químicas esperadas, las bolitas de alginato y los microorganismos se recuperan fácilmente⁹⁶.

Se ha mencionado que las sales del ácido algínico están formadas por tres bloques: bloques M (formado por ácido β -D-manurónico), bloques G (formado por ácido α -L-gulurónico) y bloques MG (formado por ambos monómeros). En la Figura 13 se muestra la conformación de dichos bloques, que posteriormente formaran la matriz con la presencia del catión:

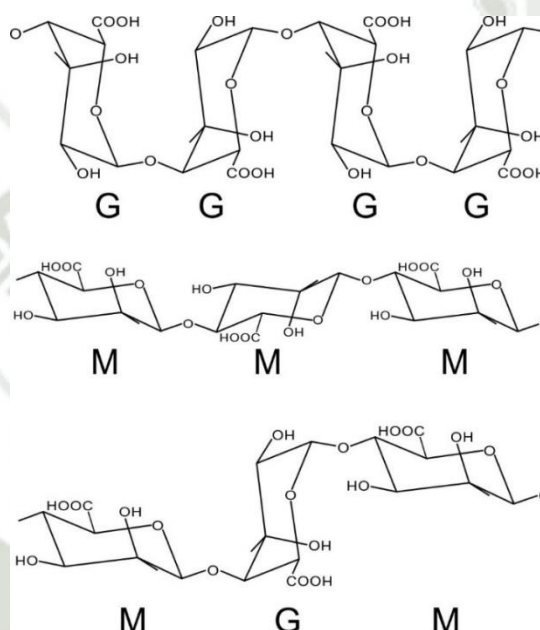


Figura 13. Diferentes tipos bloques que forman los monómeros del, ácido algínico.

(Fuente: INIVIT).

Cuando dos cadenas de bloque G se alinean, se forma sitios de coordinación debido a la forma de bucles de estas cadenas, las cavidades que se forman entre ellas tienen el tamaño adecuado para acomodar al ion Ca^{++} y además están revestidos con grupos carboxílicos y otros átomos de oxígenos electronegativos los cuales son ligandos favorables y permiten un alto grado de coordinación de los iones calcio⁹⁷. Por esta razón este modelo es llamado el modelo de la caja de huevos, como se muestra en la figura 14:

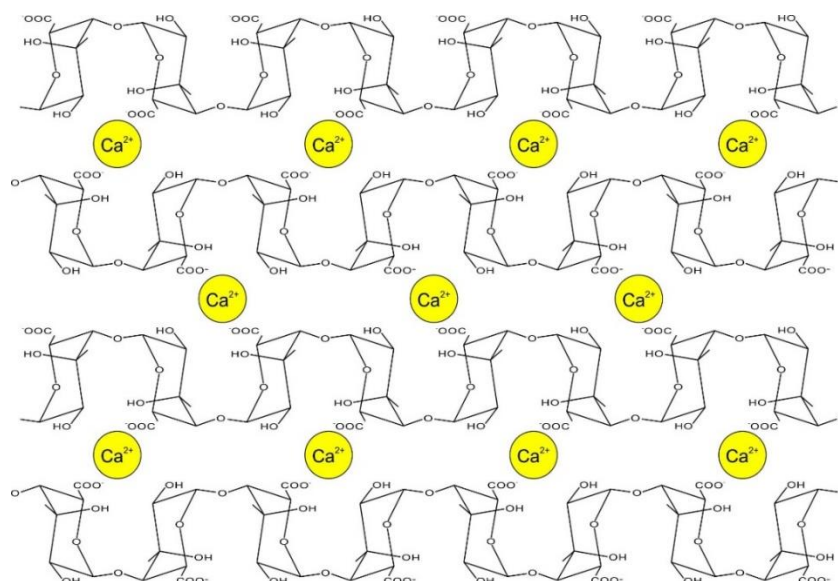


Figura 14. Modelo caja de Huevos para dar explicación a las propiedades gelificantes de los alginatos al reaccionar con sales cálcicas. (Fuente: INIVIT).

Este modelo fue propuesto por Grant en 1973 para dar la explicación a las propiedades gelificantes de los alginatos al reaccionar con sales cálcicas.

1.11. BIORREACTORES

El biorreactor es el centro de todo proceso biotecnológico. El diseño y análisis del comportamiento de un biorreactor dependen del conocimiento de la cinética de las reacciones biológicas y de los balances de materia y energía. Un biorreactor es un recipiente o sistema que mantiene un ambiente biológicamente activo. El diseño de biorreactores es una tarea complicada, basada en principio científico y de ingeniería y en muchas reglas empíricas. Los aspectos específicos del reactor y su operación incluyen varias decisiones críticas⁶³.

- Configuración del reactor
- Tamaño del reactor
- Condiciones del proceso dentro del reactor
- Modo de operación

Las decisiones tomadas en el diseño del reactor tienen un efecto considerable sobre el rendimiento global del proceso, además, los procesos de transferencias de masa y calor añaden complejidad al problema⁶³.

Existen muchas clases de biorreactores, a fin de escoger el más óptimo, se tiene que entender la cinética de eliminación del sustrato por los diferentes tipos de microorganismos, así como las propiedades fundamentales de los diferentes tipos de reactores⁹⁸.

Adicionalmente, se debe tomar en cuenta otros factores que influyen en la elección entre los diferentes tipos de reactores, los que pueden incluir, características físicas y químicas del residuo considerado, la concentración de contaminantes que se traten, la presencia o ausencia de oxígeno, la eficiencia del tratamiento y fiabilidad del sistema requeridos, las condiciones climáticas bajo las cuales va a operar el reactor, el número de procesos biológico diferentes a los que afecta el sistema de tratamiento de conjunto, la experiencia de quienes van a trabajar en la instalación y los costes de emplazamiento, tipos determinados para la construcción y operación de las posibles configuraciones de reactor⁹⁸.

1.11.2. Tipos de biorreactores

Según el uso de los biorreactores, estos pueden clasificarse en:

I. Reactores básicos

- **Discontinuo:** Prueba DBO, tiene un alto rendimiento en la eliminación de componentes individuales de aguas residuales.
- **Tanque agitado de flujo continuo (CSTR):** Digestión anaerobia de lodos y aguas concentradas, balsas aireadas para tratamiento de residuos industriales, estabilización de estanques para aguas residuales industriales y municipales, parte de tratamiento de loco activo de aguas residuales industriales y municipales.
- **Flujo pistón:** tratamiento de loco activo de aguas residuales industriales y municipales, tratamiento de balsas aireadas de residuos industriales y municipales, nitrificación, eliminación altamente eficaz de componentes individuales de aguas residuales.

II. Reactores de película fija

- **Lecho relleno:** Tratamiento aerobio y anaerobio de aguas residuales industriales y municipales, eliminación de materia orgánica, nitrificación, desnitrificación.
- **Lecho fluidizado:** Tratamiento aerobio de aguas residuales de baja concentración de DOB, biodegradación de productos orgánicos tóxicos, tratamiento anaerobio, desnitrificación.
- **Contactor biológico rotativo (RBC):** Tratamiento aerobio de aguas residuales industriales y municipales, eliminación de productos orgánicos, nitrificación.

III. Disposición de reactores

- **Reciclo:** Tratamiento aerobio y anaerobio de aguas residuales industriales y municipales, especialmente de baja concentración de BOD, eliminación de productos orgánicos, nitrificación desnitrificación.
- **En serie:** Eliminación de DBO combinada con nitrificación o con nitrificación y desnitrificación o combinada con eliminación biológica de fosforo, tratamiento anaerobio en etapas, tratamiento de estabilización de estanques, tratamiento anaeróbico y secuencia de aguas residuales tales como la eliminación de productos químicos orgánicos tóxicos específicos.
- **En paralelo:** Utilizados generalmente para redundancia y fiabilidad en el funcionamiento de plantas, especialmente con elevados flujos en conjunto de aguas residuales.
- **Híbrido:** Utilizados en formas combinadas de tratamiento tales como eliminación de productos orgánicos y nitrificación, nitrificación y desnitrificación, tratamiento anaerobio de aguas residuales industriales.
- **Discontinua secuencia:** Muy útiles por su gran rendimiento en la eliminación de componentes como productos orgánicos biodegradables pero peligroso, combinado

con eliminación de productos orgánicos, nitrógeno y fósforo; combinación de procesos aerobios y anaerobios con los mismos microorganismos ⁹⁸.

1.11.3. Reactor tipo lecho fluidizado

El fenómeno de la fluidización se da a partir del flujo de un fluido (líquido, gas o ambos) a través de un lecho compuesto por partículas sólidas, a medida que el flujo se incrementa las partículas son elevadas levemente y dejan de estar en permanente contacto unas con otras, logrando un efecto final de mezcla donde se ve favorecido el contacto entre las fases presentes, generando en el sistema reaccionante alta conversión y eficiencia.

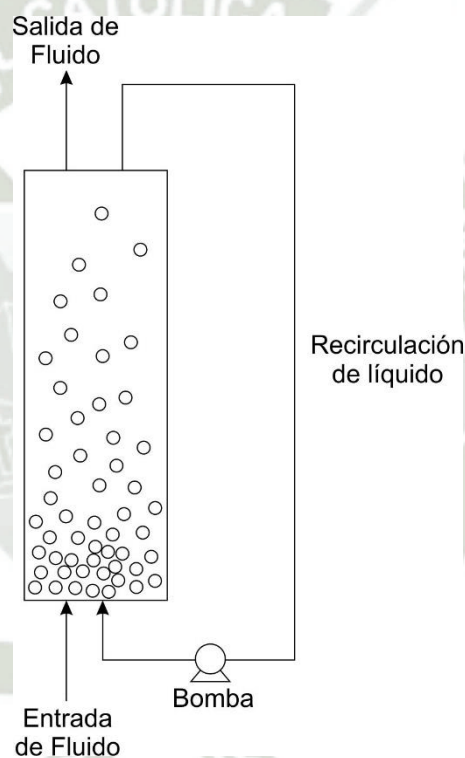


Figura 15. Esquema general de un biorreactor tipo lecho fluidizado.

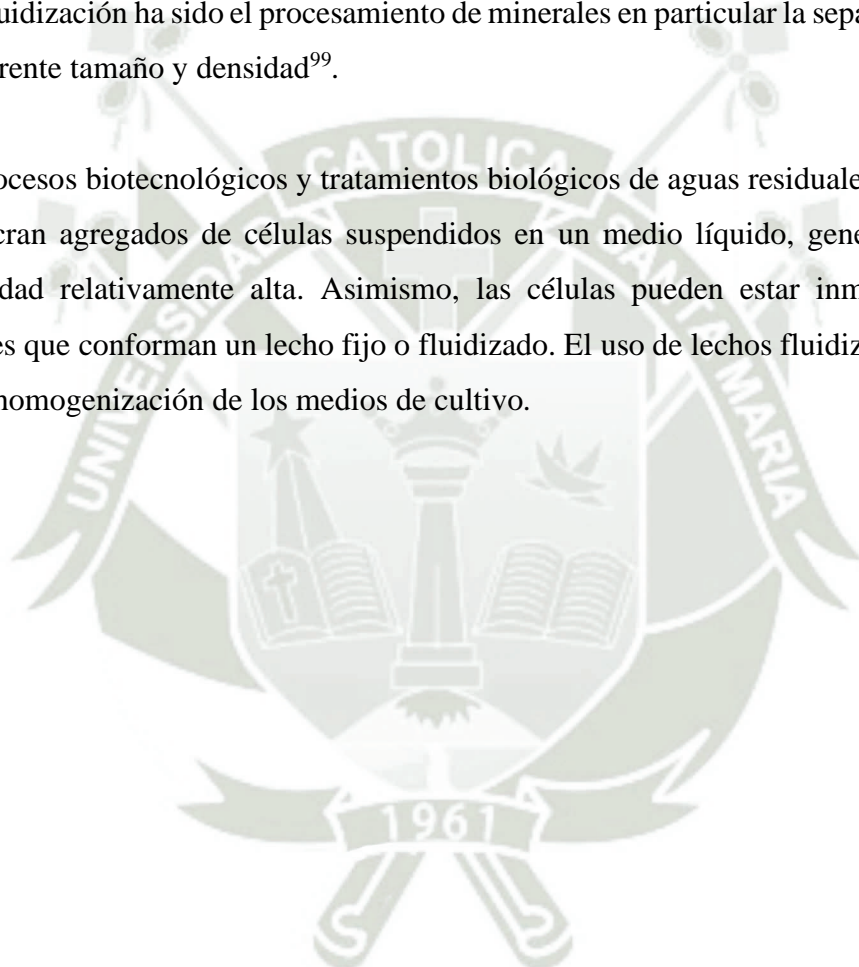
Cuando se hace fluir hacia arriba un líquido sobre un lecho empaquetado de partículas de catalizador de tamaño y densidad apropiados, este se expande debido al movimiento ascendente de partículas. Este es el fundamento de operación de los reactores de lecho fluidizado, tal como se muestra en la figura 15.

Aprovechando que las partículas presentes en los lechos fluidizados están en continuo movimiento y no producen canalizaciones ni atascos en el mismo, el fluido puede introducirse directamente en la columna. Los reactores de lecho fluidizado se utilizan en el

tratamiento de residuos con arena o un material similar que soporta las mezclas de poblaciones microbianas. También pueden utilizarse con organismos floculantes en los procesos de fabricación de cerveza o en la producción de vinagre.

La fluidización líquido-sólido tiene potencial aplicación en diversas áreas de la industria, especialmente para procesos biotecnológicos y operaciones de purificación de macromoléculas y para tratamiento de aguas residuales. Durante años, el uso más tradicional de la fluidización ha sido el procesamiento de minerales en particular la separación de sólidos de diferente tamaño y densidad⁹⁹.

Los procesos biotecnológicos y tratamientos biológicos de aguas residuales frecuentemente involucran agregados de células suspendidos en un medio líquido, generalmente de una viscosidad relativamente alta. Asimismo, las células pueden estar inmovilizadas sobre soportes que conforman un lecho fijo o fluidizado. El uso de lechos fluidizados permite una mejor homogenización de los medios de cultivo.



CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

2.1.LUGAR DE EXPERIMENTACIONES

- Laboratorios de la Universidad Católica de Santa María, pabellón H.
- Instituto ADN Uchumayo
- Centro de Investigación en Ingeniería Molecular (CIIM)
- Instituto de Investigación, Innovación y Desarrollo Biológica – Ambiental (IIDBA)

2.2.MATERIALES

Material de vidrio

- Matraces de 50, 100, 250, 500 y 1000 mL
- Vasos precipitados de 50, 100,250 y 500 mL
- Bagueta
- Tubos de ensayos
- Placas Petri

Material biológico

- Relaves Mineros

Equipos

- Autoclave Vertical Analógico. FRAVILL AV 30-280307
- Cocina eléctrica
- Estufa
- Incubadora SELECTA SA. 2000207
- Balanza Digital 200g OHAUS adventurer AR2140
- Transiluminador UV
- Termociclador AMPLITRON II DB80240-33
- Computador Personal
- Cámara de Electroforesis
- Electrodo de medición de pH y temperatura.

- BRLF.
- Microondas Sansumg MS402MADXBB
- pH metro HANNA H1223 pH/ORP
- Termociclador AMPLITRON DB80240-33
- Termociclador Master bio rad (mycycler™ thermal cycler system with gradient option)
- Baño María H.W.Kensel S.A. SELECTA 6000140
- Frigider BOSCH ECO-TT423 LXL

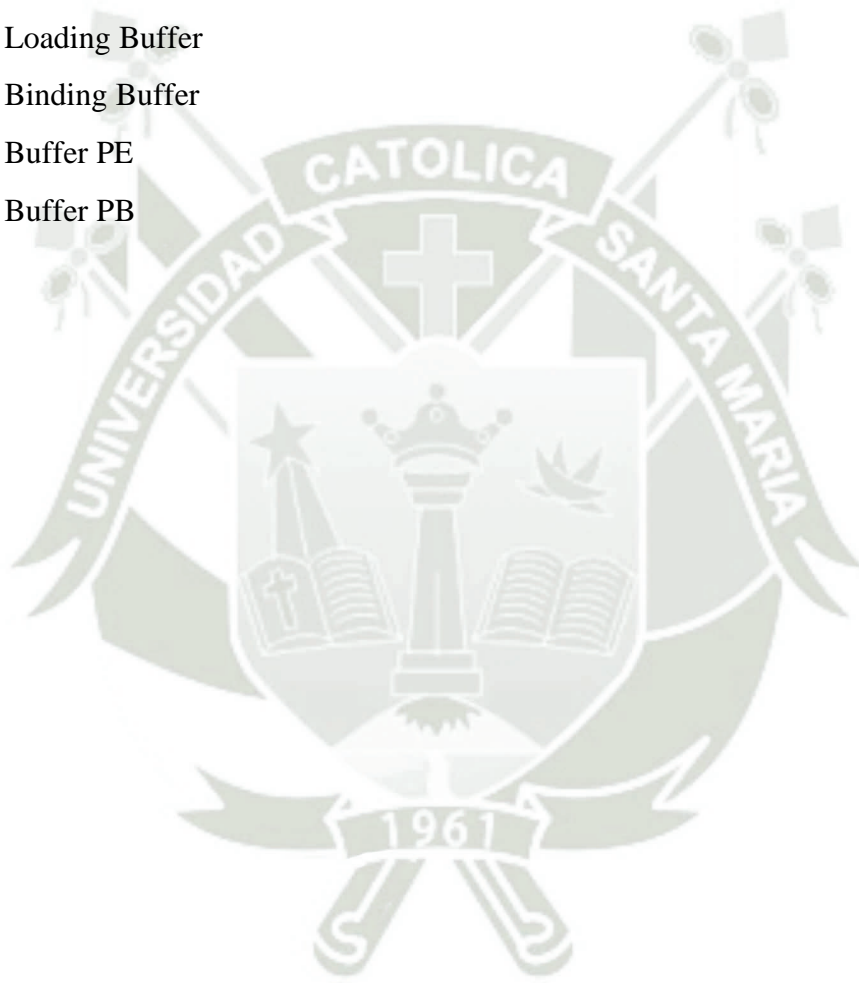
Otros

- Espátula
- Asa de kolle
- Mechero
- Papel Aluminio
- Plastigraf
- Eppendorf
- Puntas para micropipeta

Reactivos químicos

- Caldo Nutritivo, Scharlau.
- Medio LIA
- Medio TSI
- Medio Urea
- Medio Citrato de Simmons
- Peróxido de Hidrogeno
- Agar Nutritivo, MERCK
- Agar cetrimide
- Nitrato de Mercurio, Biolab Reagent.
- Ac. Nítrico cc.
- Hidróxido de Sodio
- Alginato de Sodio
- Cloruro de Calcio
- Tris-EDTA

- Hielo
- Mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico
- Isopropanol
- Etanol al 75%
- Agua destilada estéril
- Buffer TAE 1X
- Super mix (Platinum PCR Supermix High Fidelity)
- Loading Buffer
- Binding Buffer
- Buffer PE
- Buffer PB



2.3.METODOLOGÍA

2.3.1. Toma de muestra

La muestra que se utilizó fue recolectada de los efluentes de las chancadoras y quimbaletes artesanales ubicados en el sector de El Pedregal, en la provincia de Caylloma, departamento de Arequipa; que se emplean en el proceso de extracción de oro usando agua y mercurio. Se eligió un centro de procesamiento artesanal de mineral por sus características tales como su cercanía a centros poblados, cantidad de personas que trabajan y el entorno ambiental en que está rodeado; ya que, en el lugar de extracción, está constituido por varias chancadoras y que todos sus efluentes desembocan en un solo pozo que funciona a manera de relavera, la recolección de la muestra se realizó a la entrada de este pozo donde descargan todos los efluentes.

La toma de muestras se realizó en base al protocolo nacional de monitoreo de la calidad del Agua establecida por la Autoridad Nacional del Agua (ANA), en cual se indica que se debe recoger una muestra representativa de agua, con un volumen apropiado, para realizar los análisis necesarios de los parámetros establecidos, el monitoreo se realizó de manera directa en muestras puntuales (en las salidas de los Quimbaletes), con la ayuda de una jarra de plástico de 1000 mL, se enjuagó tres (03) veces con la muestra a recoger y la cuarta (04) se llenó aproximadamente 900 mL de muestra, en un frasco de polietileno de boca ancha estéril de 1000 mL de capacidad, se tapó fuertemente y se rotuló de forma adecuada. Este procedimiento se realizó hasta obtener 5 litros de muestra para los distintos análisis a realizar. Finalmente, las muestras fueron transportadas al laboratorio de Biotecnología de la Universidad Católica de Santa María (UCSM) en Arequipa para su análisis y procesamiento manteniéndose a 4°C y para determinar la concentración de mercurio (Hg) total.

2.3.2. Aislamiento de microorganismos nativos presentes en la muestra recolectada

Se utilizó un medio general para el aislamiento, en este caso caldo nutritivo (Anexo 1) ya que contiene fuentes de carbono y de nitrógeno fundamental para el crecimiento de diferentes bacterias que puedan estar presentes en la muestra⁷³.

Se preparó 200 mL de caldo nutritivo, para ello se pesó 2.6 g de medio el que se disolvió en 200 mL de agua destilada en un matraz, se esterilizó en un autoclave a 120°C y 15 psi por

20 minutos, se enfrió y se inoculó con 10ml de relave, con una pipeta estéril y se incubó por 72 horas en shaker a 60 RPM y 37°C.

Pasada las 72 horas y apreciando turbidez en el matraz, se preparó agar nutritivo, el cual contiene los mismos componentes que el caldo nutritivo añadiéndole agar (Anexo 2). Se pesó 1.55g de agar nutritivo, se disolvió en un matraz de 10 mL con 50 mL de agua destilada, se autoclavó a 120°C de temperatura y 15 psi de presión por 20 minutos. Posteriormente se distribuyó en 10 placas petri descartables estériles, bajo mechero Bunsen. Una vez frías las placas, con un asa de kolle se cogió la muestra del caldo nutritivo y se sembró por agotamiento en dos placas, se llevaron a incubación a 37°C junto con una placa sin sembrar el cual fue nuestro blanco. Se rotuló adecuadamente y se dejó esperar crecimiento por aproximadamente 48 a 72 horas. Las demás placas se guardaron para posteriores replicas.

2.3.3. Aislamiento de *Pseudomonas*.

Se usó un medio de cultivo sólido específico ya establecido, el agar cetrimide (Anexo 2), selectivo para *Pseudomonas*⁷⁵. Se calculó el peso del agar para un total de 25 mL de medio (1.2 g de agar cetrimide y 2 mL de glicerina a pH 7), se autoclavó y fue distribuido en 5 placas Petri descartables estériles.

Una vez preparado el medio cetrimide; se sembró por agotamiento con un asa de kolle una muestra de las colonias que presentaron crecimiento en el agar nutritivo; se llevó a incubadora a 37°C por 48 horas, junto con una placa con agar cetrimide sin sembrar para el control, se rotulo adecuadamente.

Se observó en cámara UV (luz ultravioleta, a una longitud de onda de 254nm) la emisión fluorescencia de la bacteria, y además la aparición de coloración en el medio de cultivo.

2.3.4. Caracterización morfológica y bioquímica

Se empezó con la caracterización morfológica y bioquímica, para posteriormente realizar la caracterización molecular, ya que lo que deseamos es obtener cepas de *Pseudomonas*; por lo tanto, primero se realizó la identificación morfológica y bioquímica según los siguientes métodos:

2.3.5. Caracterización Morfológica

Tinción Gram:

Con esta prueba se diferenció el tipo de bacteria que hemos aislado, Gram positiva o Gram negativa⁶⁹, se procedió de la siguiente manera:

- Se colocó una gota de suero en el portaobjetos y se inóculo con un asa de Kolle la colonia extraída del agar cetrimide.
- Se fijó el material inoculado al portaobjetos de modo que no sea arrastrado en el proceso de tinción y lavado (fijamos la muestra pasando unas 4 o 5 veces esta por la llama del mechero).
- Se colocó el portaobjetos sobre la cubeta de tinción y se cubrió su superficie con el cristal violeta.
- Se dejó actuar durante 1 minuto el cristal violeta y después se lavó con agua.
- Se aplicó lugol sobre la superficie del portaobjeto durante 1 minuto.
- Se cogió el portaobjetos con cuidado y se lavó con alcohol-acetona hasta que no se arrastre más color violeta (10 a 15 segundos como máximo).
- Nuevamente se lavó con agua y se dejó una fina capa sobre el preparado. A continuación, cubrimos con el colorante de contraste (safranina), aproximadamente por 30 a 40 segundos.
- Finalmente se lavó con agua, dejamos escurrir el exceso del colorante en posición vertical y secamos al aire.
- Se colocó una gota de aceite de inmersión y se observó al microscopio en objetivo de 100x⁶⁹.

2.3.6. Caracterización Bioquímica

A. Catalasa

La catalasa es una enzima que está presente en la mayoría de bacterias aerobias. Tiene como función descomponer el peróxido de hidrogeno en agua y oxígeno. Para dar un resultado positivo tiene que mostrarse la formación de burbujas, esto indicaría la liberación de oxígeno⁷¹, el procedimiento es el siguiente:

- Se colocó en un portaobjetos una gota de agua oxigenada con ayuda de una pipeta.

- Sobre la gota de agua oxigenada con ayuda de un asa de kolle se colocó la bacteria aislada.
- Se observó producción de burbujas.

B. Urea

Este medio es utilizado para la diferenciación de microorganismos que tiene actividad ureásica, se utiliza para identificar bacterias que hidrolizan urea, tales como *Proteus*, otras enterobacterias y estafilococos.

Se determinó la actividad ureásica de la bacteria preparando el medio en un tubo de ensayo en forma de pico de flauta donde se hizo la siembra en forma estriada para que sea incubado a 35-37°C por 24 horas.

C. TSI (Agar-Hierro-Triple azúcar)

Este medio es utilizado generalmente para la diferenciación de enterobacterias basándose en la fermentación de lactosa, sacarosa y la producción de ácido sulfhídrico.

En un tubo de ensayo se preparó el medio enfriando en pico de flauta, se sembró picando el fondo extendiendo sobre la superficie del medio e incubo a una temperatura entre 35-37°C por 24 horas.

D. LIA (Lisina Hierro Agar)

Este medio de cultivo es usado para la diferenciación de microorganismos basándose en la descarboxilación/desanimación de la lisina y en la producción de ácido sulfhídrico.

Se preparó el medio de cultivo en un tubo de ensayo que se dejó enfriar en forma de pico de flauta dejando apto para punción, luego de la siembra se dejó incubar por 24 horas a 35-37°C.

E. Citrato Simmons

Citrato Simmons es un medio utilizado para diferenciar enterobacterias en base a la capacidad de usar citrato como única fuente de carbono y energía.

En un tubo de ensayo se colocó el medio previamente preparado el cual se dejó enfriar en posición inclinada. Se sembró la superficie del medio evitando arrastrar el medio y se dejó incubar entre 24-48 horas a 35-37 °C en aerobiosis.

F. Agar Cetrimide

Para la preparación de este medio selectivo utilizó 45.3 g del medio en un litro de agua destilada al cual se le agregan 10 mL de glicerol. Reposó 10 a 15 minutos. Se calentó y agitó frecuentemente hasta el punto de ebullición durante 1 minuto para disolverlo por completo. Se esterilizó en autoclave a 121°C (15 lbs de presión) durante 15 minutos. Se enfrió aproximadamente a 45°C, para verterlo sobre placas de Petri estériles para proceder a la siembra⁷⁵.

2.3.7. Caracterización molecular y análisis filogenético de la bacteria aislada a partir de relave minero.

a. Extracción de ADN de la bacteria aislada

A partir del cultivo puro el ADN fue aislado de la siguiente manera:

Utilizando un asa de kolle se tomó una asada de colonia de la placa Petri, esta fue resuspendida en un tubo eppendorf con 200 uL de T.E. (Tris-EDTA). Seguidamente se incubó en hielo por 5 minutos, para romper las paredes celulares se sonicaron 2 veces a una potencia #15 por 30 segundos, se colocó nuevamente en hielo por 3 minutos más, se sonicó una vez más a una potencia de #10 por 30 segundos, después de este periodo añadimos 500 uL de la mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico para seguidamente agitarlo vigorosamente 50 veces o usando el vórtex. Se centrifugó por 5 minutos a 1300 RPM (en esta parte de debe tener un volumen aproximado de 1000 uL (500ul de T.E. + 500ul F:CL:AI.)).

Una vez realizado este procedimiento se formaron tres fases (una fase acuosa, una interface y una fase orgánica). Se recuperó el sobrenadante en un nuevo tubo eppendorf (aprox. 300-400 uL de muestra) sin tocar la interfase, añadimos 800 uL de Isopropanol y se centrifugó por 10 minutos a 13000 RPM (se verificó si hubo precipitación), una vez centrifugada la muestra se eliminó el isopropanol por inversión en un papel toalla una sola vez para finalmente quedarnos con el pellet. Se lavó con 500 uL de etanol al 75%,

nuevamente se centrifugó a 13000 RPM por 30 – 60 segundos para volver a retirar el sobrenadante por inversión, se centrifugó otra vez a 13000 RPM por 30 segundos y utilizando una micropipeta de 200 uL se retiró con mucho cuidado el sobrenadante tratando de no tocar el pellet. Se secó a 60°C por 5 minutos en un termoblock, luego el ADN fué resuspendido con 100 uL de agua destilada estéril para finalmente analizar el ADN por electroforesis y así determinar su integridad.

b. Amplificación de la secuencia DNAr 16S

Luego de determinar la integridad del ADN mediante electroforesis se realizó su amplificación utilizando la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction).

Primeramente, se añadió en un tubo de PCR 2uL de la muestra de ADN, también se agregó 2 uL de la solución de primers (Forward y reverse) y finalmente se agregó 45 uL de solución Super mix (Platinum PCR Supermix High Fidelity), el tubo fue colocado en el termociclador Master bio rad (mycycler™ thermal cycler system with gradient option) de Eppendorf, el cual se programó de la siguiente manera.

Primero a una temperatura de 95°C por 5 minutos para desnaturalizar completamente el ADN molde y activar la Taq polimerasa. Se programó 25 ciclos de 94°C por 60 segundos (desnaturalización), 55°C por 60 segundos (hibridación) y 60°C por 60 segundos (extensión). Finalmente 1 ciclo de 72°C por 7 minutos. Acabada la amplificación la muestra se dejó en el termociclador a 4°C (post incubación).

c. Electroforesis y purificación de producto de PCR

Se realizó la electroforesis para verificar si se amplificó el gen, para lo cual se preparó un gel de agarosa el cual fue colocado en una cámara electroforética cubierta con buffer TAE 1X en el que se colocó 5 uL del producto de la PCR previamente cargado con 2 uL de Loading Buffer. La corrida electroforética se realizó a una potencia de 120 V por 60 minutos, finalmente el gel fue observado al transiluminador UV.

Para la purificación del producto de la PCR se utilizó una columna de purificación que dejara limpia la banda siguiendo el procedimiento. Se utilizó buffer PE y Buffer PB.

Se agregó 150 uL de Binding buffer, esto se hizo resuspendiendo, luego se centrifugó por 1 minuto. Se lavó con wash buffer 500 uL y se deja por 5 minutos en reposo, pasado este tiempo se elimina en el wash buffer y nuevamente se centrifugó por 1 minuto, se volvió a eliminar lo que pueda quedar de wash buffer centrifugando por 1 minuto. Seguidamente se pasó la columna a un tubo eppendorf agregando 50ul de agua y se dejó en reposo por 5 minutos.

d. Análisis filogenético de la secuencia del ARNr 16 S.

Para una mayor fidelidad del resultado, el ADN de la cepa en estudio fue enviado al laboratorio asociado a LabADN Uchumayo en Estados Unidos de América, para su secuenciación.

Las secuencias del gen RNAr 16S de nuestra cepa nativa, fue entregada corregida de posibles errores y gaps en el programa Bioedit versión 7.0.5.2.

Las secuencias de RNAr 16S tanto forward y reverse, fueron ancladas con CAP 3 que se encuentra en el programa computacional UGENE, esta secuencia, se llamó MUESTRA y se introdujo en la base de datos del GenBank utilizando el algoritmo BLAST, (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST), el cual nos mostró secuencias con identidad al 99 y 100% con bacterias del género *Pseudomona*.

Se extrajo las secuencias en formato FASTA con identidad al 100% y se guardó en un block de notas en formato “*.fasta”.

Posteriormente se utilizó el algoritmo CLUSTALW 2.1, con la finalidad de alinear las secuencias para encontrar sitios homólogos entre ellos, también se obtuvo una matriz de identidad en la cual se observó el porcentaje de identidad con cada secuencia.

Luego se usó GBLOCK 0.91 para eliminar los GAPS (espacios huecos vacíos), posteriormente con el programa computacional MESQUITE 3.2. se generó un formato “*.nex”; en seguida, se usó el programa MR BAYES que está fundamentado con la

Inferencia Bayesiana que usa las cadenas de markov MCMC, este método es usado debido a que es un método estocástico que trabaja con todos los datos.

Finalmente se usó el Figtree 1.4.1 para visualizar el árbol filogenético generado y observar las distancias.

2.3.8. Determinación de la cinética de crecimiento

Se utilizó el medio King B (composición Anexo 2), un medio también específico para el crecimiento de *Pseudomonas*, primero se preparó dos matraces con 200 mL de medio King B, se verificó que el pH sea ligeramente neutro, se esterilizó a 120°C de temperatura y a 15 libras de presión durante 20 minutos. En condiciones de esterilidad, con un asa de kolle estéril y bajo un mechero se inoculó una colonia de bacterias del agar cetrimide, en un matraz con medio, se selló y rotuló adecuadamente el matraz y se llevó a incubación a temperatura de 37°C, durante 48 a 72 horas. El otro matraz se mantuvo como control (sin inocular), igualmente se llevó a incubación.

Se realizó el conteo celular cada 3 horas, haciendo el recuento de bacterias, en cámara de Neubauer; con una micropipeta estéril, se tomó 500 uL del medio de cultivo y se colocó en un eppendorf, de este se sacó 20 uL y se colocó con mucho cuidado en la cámara para realizar el conteo en microscopio óptico, tratando de que ésta se extienda uniformemente en toda el área.

Una vez realizado el conteo en la cámara en el área central, se aplicó la siguiente fórmula de la ecuación 1, para determinar el número de células por mililitro.

Se realizó el conteo hasta obtener la fase se latencia de la bacteria, para poder volver a inocular a otros matraces y por duplicado.

Culminado este procedimiento se preparó otros tres matraces con 200 mL de medio King B cada uno. Una vez esterilizados los medios se inoculó por duplicado, se calculó la cantidad necesaria para obtener una concentración de 1×10^6 cel/mL en el medio de cultivo. Se mezcló bien cada matraz, y se llevó a incubación en shaker a 70 rpm y 37°C, se realizó mediciones cada 3 horas por un periodo de 48 a 72 horas, y se volvió a contar directamente

las células en cámara de Neubauer, se aplicó la fórmula de la ecuación 1, la cual se muestra a continuación:

$$N = N_0 e^{\mu t} \quad (1)$$

Dónde:

μ : constante específica de crecimiento (T^{-1})

N: concentración final de células viables ($Kg.m^{-3}$)

N_0 : concentración inicial de células viables. ($Kg. m^{-3}$) a tiempo cero.

t: tiempo (hrs).

Obtenidos estos datos conoció la cinética de crecimiento de la bacteria aislada, con la finalidad de inocular la cantidad exacta de células para la siguiente metodología.

A su vez, se controló la pureza de los medios, realizando coloraciones de Gram, para asegurar solo la presencia de la *Pseudomona* y no se contamine el medio de cultivo.

2.3.9. Determinación de la cinética de crecimiento a distintas concentraciones de mercurio.

Se llevó acabo la adaptación en Mercurio de la bacteria aislada, para determinar la concentración máxima tolerable, conociendo la cinética de su crecimiento microbiano estudiada en la metodología anterior.

Se usó el medio específico King B, para observar que solo crezca *Pseudomona sp* y no exista contaminación, con la variación de incorporar $Hg(NO_3)_2.H_2O$ (Nitrato de mercurio) en concentraciones diferentes, se escogió este compuesto ya que es soluble en agua.

Primero, se realizó los cálculos necesarios para tener una solución stock de 50 ppm de Hg total a partir de $Hg(NO_3)_2.H_2O$; para lo cual, se pesó 8.54 mg de Nitrato de mercurio, y se enrasó en una fiola de 100 mL con ácido nítrico concentrado. Se guardó en un frasco bien sellado y rotulado.

Posteriormente, se preparó soluciones con distintas concentraciones de mercurio, utilizando el medio King B, se realizó según la siguiente tabla 5:

Tabla 5. Concentraciones de Hg para analizar cinética microbiana

Matraz	CC de Hg (ppm)	King B (mL)	Solución stock de Hg(NO₃)₂.H₂O (mL)
1	1	98	2
2	3	94	6
3	5	90	10
4	7	86	14
5	10	80	20
6	15	70	30
Volumen final de 100 mL			

Para realizar la preparación de estos medios, primero se preparó 620 mL del medio King B por separado, este fue autoclavado a 121°C de temperatura y a 15 lb de presión durante 20 minutos.

Posteriormente y en condiciones de esterilidad, se distribuyó el volumen indicado en la tabla 5 para cada matraz debidamente rotulado, posteriormente se adicionó los volúmenes de la solución stock de Nitrato de Mercurio, con la ayuda de una jeringa estéril y un filtro de 20 µM, esto con la finalidad de asegurar la esterilidad de la solución stock.

Estos matraces fueron inoculados con 1 mL de la bacteria inoculada, se realizó los cálculos necesarios, para obtener una concentración de 1×10^6 cel/mL en los medios de cultivo.

Se realizó mediciones para el conteo de células cada 3 horas en cámara de Neubauer, se realizó diluciones con suero, en caso sea necesario, este procedimiento se realizó por aproximadamente 72 horas. También se controló que el valor de pH este entre 6 y 7 ya que es el valor adecuado de crecimiento de la bacteria y por la adición de la solución stock de nitrato de mercurio puede bajar este nivel, para esto se reguló con Hidróxido de Sodio al 5%.

Todos los matraces fueron colocados en sheaker a 70 rpm y 37°C, se controló también la no existencia de contaminantes en el medio realizando tinciones de Gram. Todo el procedimiento fue realizado por duplicado para obtener datos más confiables.

2.3.10. Inmovilización en alginato de calcio.

Se preparó 100 mL de una solución de Cloruro de Calcio al 20% p/v, también se preparó una solución de alginato de sodio al 3% p/v, se pesó 0.75 g de alginato y se adicionó 25 mL de agua destilada, se agitó rápidamente y ligeramente tibio en un termoplate y con la ayuda de una jeringa se cogió la solución y se dejó caer gota a gota en un beaker conteniendo la solución de cloruro de calcio, produciéndose así la reacción de sustitución para formar el alginato de calcio insoluble, este procedimiento lo repetimos 4 o 5 veces para obtener aproximadamente un volumen de 60 mL en esferas de alginato para ser usadas en la experimentación de remoción de mercurio, todo condiciones de esterilidad. Finalmente llevamos las esferas de alginato de calcio a enfriar a 4°C por 3 horas para que puedan terminar de endurecer lo suficiente⁸³. Estas esferas de alginato de calcio las fueron usadas como blanco para las experimentaciones.

También se prepararon otras esferas conteniendo las bacterias aisladas, para ello solo sustituimos el agua destilada por el medio de cultivo con bacterias; este medio lo escogimos de datos obtenidos de la cinética adaptación de las bacterias al mercurio.

Las esferas ya formadas de alginato de calcio que contienen las células ya atrapadas se enfriaron en la nevera a 4°C por 2 horas para garantizar la formación de esferas completamente insolubles en agua⁸³.

2.3.11. Determinación de la capacidad de remoción de mercurio total, usando la bacteria aislada mediante un BRLF

Para esta etapa se utilizó un BRLF, que fue obtenido en los laboratorios de la UCSM, éste equipo tiene una capacidad de 60 mL de volumen interior, está compuesto por una chaqueta externa que permite el flujo de agua a una determinada temperatura (figura 16). Este equipo se utilizó en forma vertical, donde el medio a analizar se introdujo por la parte inferior y con el impulso de una bomba peristáltica, que toma la muestra a analizar contenida en un frasco estéril, se generó la recirculación del fluido, que sale por la parte superior y vuelve hacia el frasco esto por unas mangueras de 1cm de diámetro.

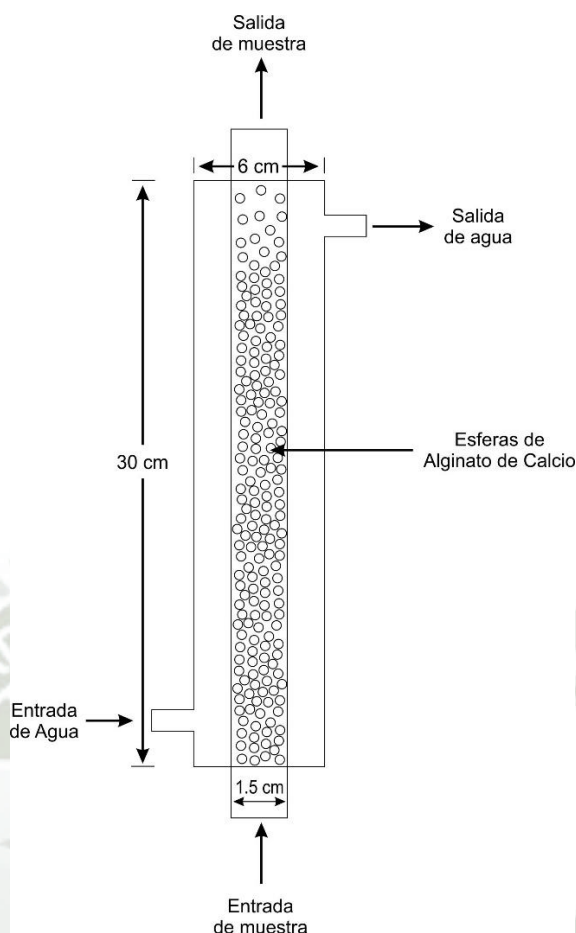


Figura 16. Esquema del BRLF que se usó para las experimentaciones.

Los pasos realizados para determinar la capacidad de remoción de mercurio total, usando la cepa aislada de los relaves fueron los siguientes:

Se realizaron dos diseños experimentales, uno utilizando una muestra sintética conteniendo solo mercurio a partir de una solución stock de Nitrato de mercurio; y otro, con los relaves que se extrajeron de las mineras informales. En cada experimentación, se usó 50 mL de esferas de alginato de calcio, una con las bacterias atrapadas en las perlas y otra sin bacterias que fueron utilizadas como blanco. Estas esferas fueron ingresadas cuidadosamente en el biorreactor de lecho (figura 17), (previamente esterilizado, con todos los materiales e instrumentos necesarios) con la ayuda de una bagueta, todo esto se realizó en una cámara de flujo laminar para evitar contaminación.



Figura 17. BRLF usado para las experimentaciones.

Se colocó el biorreactor apoyado en trípodes, también se conectó las mangueras para la recirculación del agua en un baño maría, para mantener la temperatura a 37°C. Finalmente se conectó las mangueras tanto de ingreso como de salida del biorreactor a un recipiente que contuvo 500 mL de la muestra a analizar (una experimentación con relave y otra con muestra sintética). La bomba peristáltica se regulo para que funcione a una circulación del medio de 25 mL/min. (figura 18).

Para la preparación de la muestra sintética, se procedió a preparar una solución stock de 50 ppm con la misma metodología que se preparó anteriormente (se pesó 8.54 mg de $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y se enrasó a 100 mL con ácido nitrito concentrado en una fiola). Las soluciones sintéticas se prepararon a 5 ppm de Mercurio total, según Capolino, usualmente se utiliza una concentración de 5ppm para seleccionar las bacterias resistentes a mercurio, para lo cual medimos 50 mL de la solución stock (se pasó por filtro de 20 uM para esterilizarlo) y se llevó a 500 mL con agua destilada estéril. Al momento de colocar esta solución sintética en experimentación, se reguló el nivel de pH con hidróxido de sodio, ya

que, por el ácido nítrico, el pH suele ser ácido para las bacterias, ya que su crecimiento adecuado es a un pH entre 6 y 7.

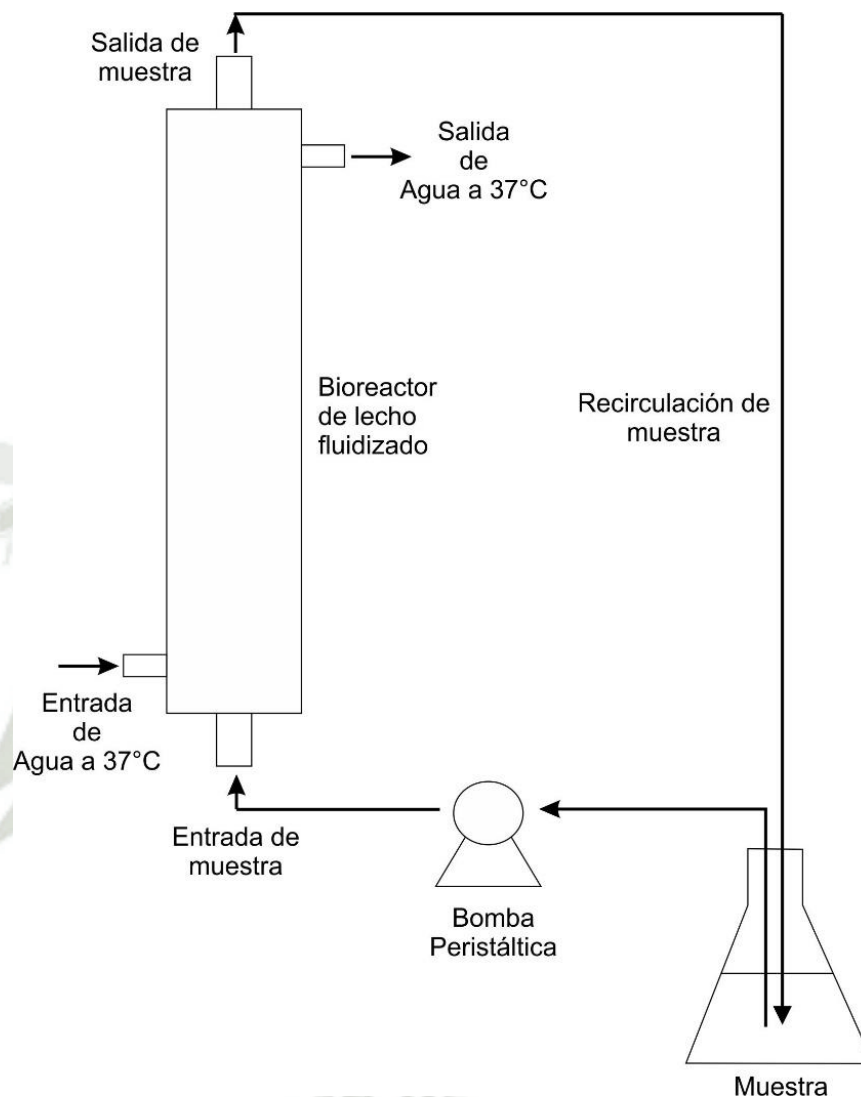


Figura 18. Diagrama del proceso experimental de remoción de mercurio usando BRLF.

Cada experimentación se dejó funcionando por un tiempo de 72 horas, y por duplicado, tanto para las bacterias atrapadas en las esferas de alginato, como para las esferas solo de alginato calcio.

Los parámetros que son constantes son los siguientes:

- Temperatura: 37°C
- pH: 6 – 7
- Flujo: 25 mL/min.

- Diámetro interno de las mangueras: 4.8mm

Finalizada las 72 horas de cada experimentación, se llevó 100 mL de muestra para realizar análisis de mercurio total por ICP al Laboratorio de Control de Calidad de la UCSM. Además, cada muestra inicial (tanto de relave como la solución sintética preparada) también fueron llevadas a analizar mercurio total.

Con los datos obtenidos se realizó un análisis estadístico para cuantificar la diferencia de absorción de mercurio total dentro de las esferas de alginato.

Adicionalmente, se comprobó realizó una experimentación para visualizar el efecto del pH con el cambio de estado del mercurio, para ello se realizó una valoración con NaOH 6M, se tomó 20 mL del stock de mercurio a 5ppm, y con un pHmetro, se procedió a adicionar cada 40 uL de NaOH 6M, y se midió el valor de pH hasta que se notó la formación de precipitado el cual indica el cambio de estado de mercurio.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1.Toma de muestras

Se recolectó la muestra de las chancadoras artesanales, se tomó como referencia la salida de los molinos de piedra llamados Quimbaletes para evitar sedimentaciones y tener una muestra uniforme, que se denominó relave minero aurífero (figura 19).

Se realizó el procedimiento descrito en la metodología para la recolección de las muestras hasta un total de 5 litros aproximadamente. Se rotularon y se guardaron en refrigeración mientras se trasladó a los laboratorios para su análisis.



Figura 19. Recolección de muestra de los relaves de las chancadoras.

Los relaves se caracterizan por tener dos fases, 80% líquido y 20% sólido, con un color café, sin olor, sin presencia de aceites (figura 20).



Figura 20. Muestra de relave sedimentada en el frasco de recolección.

El resultado del análisis de los elementos presentes en la muestra por ICP realizado en los laboratorios de control de calidad de la UCSM, fue de 0.401ppm de Hg total, lo que indica un valor muy por encima de los Límites Máximos Permisibles para efluentes de origen minero según el D.S. 010-2010 del MINAM (Anexo 1), el cual indica un valor de 0.002ppm al momento de la descarga del efluente.

3.2. Aislamiento de microorganismos nativos presentes en las muestras.

Después de 72 horas de incubación el caldo nutritivo, presentó poca turbidez, lo cual indica la existencia de bacterias, pero en poca cantidad que aún no están adaptadas al medio nutritivo.

Posteriormente en la incubación de las placas con agar nutritivo, el crecimiento de bacterias a las 24 horas fue muy escaso, a las 72 horas el crecimiento fue más visible, las dos placas sembradas presentaron un crecimiento parejo y similar, lo que confirma la presencia de bacterias en la muestra de relave recogidas.

Entre las dos placas, el crecimiento de las bacterias fue de colonias redondas y brillantes, de color blanquecino semitransparente y un desarrollo uniforme, mostrándose en la figura 21.

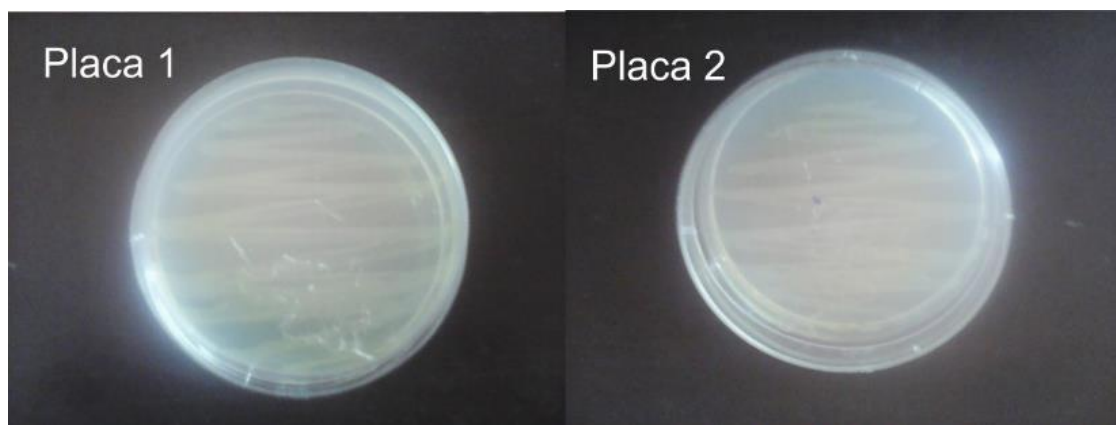


Figura 21. Crecimiento de bacterias en agar nutritivo.

3.3. Aislamiento de *Pseudomonas*.

Después de 72 horas de incubación de las placas con agar cetrimide, tuvimos que resaltar que la cetrimida (bromuro de cetiltrimetilamonio) inhibió el crecimiento de otras bacterias debido a su acción como un compuesto cuaternario de amonio. Dicho medio promueve la producción de pirocianina y fluoresceína por la presencia del Sulfato de Potasio y el Cloruro de Magnesio que se observan con la luz ultravioleta¹⁰⁰, Se observó crecimiento muy similar al crecimiento de las bacterias en agar nutritivo. El crecimiento se desarrolló de manera uniforme, se notaron colonias redondas brillantes, de color verde claro transparente.

Para verificar que las bacterias que tengamos creciendo sean posibles *Pseudomonas* se lleva a observación a luz UV a 254nm. En donde según la figura se observa la emisión de fluorescencia a los bordes del crecimiento de la bacteria, lo que confirma el crecimiento de *Pseudomonas*, (figura 22).

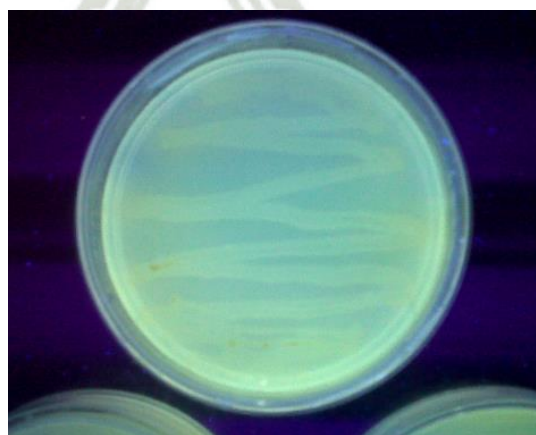


Figura 22. Emisión de fluorescencia de *Pseudomona sp.* bajo luz UV a 254nm, cultivado en agar cetrimide.

3.4. Identificación morfológica y bioquímica de la Bacteria aislada.

Tinción de Gram

Luego de haber realizado el procedimiento de tinción de Gram en una lámina portaobjetos esta fue llevada al microscopio para la observación de la bacteria a un aumento de 100X. Lo observado a través del microscopio fueron bacilos de un color rosado tenue lo cual indica que estas bacterias son bacilos gram negativos.

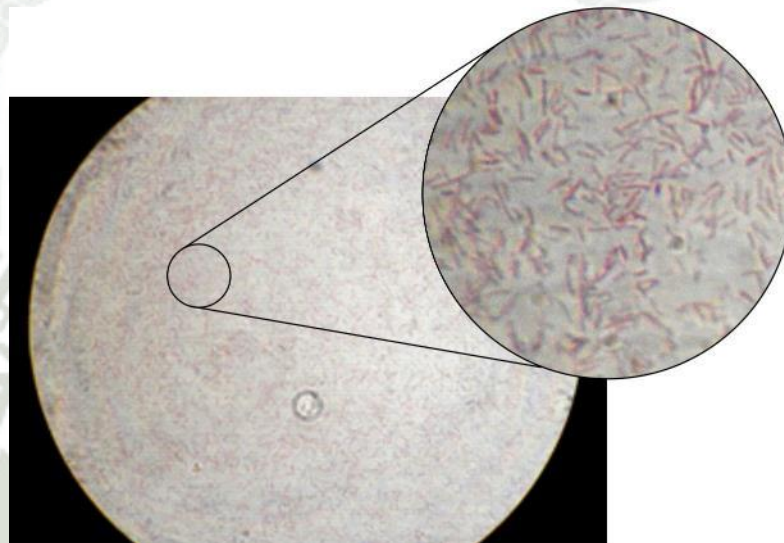


Figura 23. Tinción de Gram del cultivo aislado en agar cetrimide, en aumento de 100X.

Catalasa:

Como se observa en la figura 24, se produjo la formación de burbujas lo cual indica la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Esto significa que la prueba es positiva.



Figura 24. Prueba catalasa, para el cultivo de *Pseudomona*

TSI.

El resultado de la prueba bioquímica en medio TSI fue K/K (K=alcalino, K=alcalino) como se muestra en la figura 25.

Indica que el microorganismo no produce gas, no produce H₂S, no fermenta glucosa, no fermenta lactosa tampoco sacarosa.



Figura 25. Fotografía donde se muestra el resultado de la reacción en agar TSI tras ser inoculado con la cepa aislada.

LIA

El resultado de la prueba bioquímica en medio LIA es K/K (No hay ningún tipo de fermentación de hidratos de carbono lo cual es característico de las bacterias no fermentadoras como es *Pseudomona*, (figura 26).



Figura 26. Fotografía donde se muestra el resultado de la reacción en agar LIA tras ser inoculado con la cepa aislada.

Citrato de Simmons

El resultado de esta prueba bioquímica es positivo debido a que hay crecimiento bacteriano permitiendo que el color del medio cambie de verde a azul (figura 27).



Figura 27. Fotografía donde se muestra el resultado de la reacción en agar citrato simmons tras ser inoculado con la cepa aislada.

Agar urea

En esta prueba bioquímica se muestra que el medio original no cambio de color por lo cual podemos decir que la prueba en agar urea es negativa (figura 28).



Figura 28. Fotografía donde se muestra el resultado de la reacción en agar urea tras ser inoculado con cepa aislada.

3.5. Caracterización molecular y análisis filogenético de la *Pseudomona* aislada a partir de relave minero.

La extracción del gen rRNA 16S de muestra se realizó en los laboratorios del instituto de biotecnología del ADN Uchumayo utilizando el método antes mencionado (figura 29.)



Figura 29. Extracción de rRNA 16S de la muestra aislada.

Posteriormente se realizó una PCR utilizando 2 primers (forward y reverse) Con los productos obtenidos de la PCR se realizó la corrida electroforética en gel de agarosa al 1% como se observa en la figura 30.

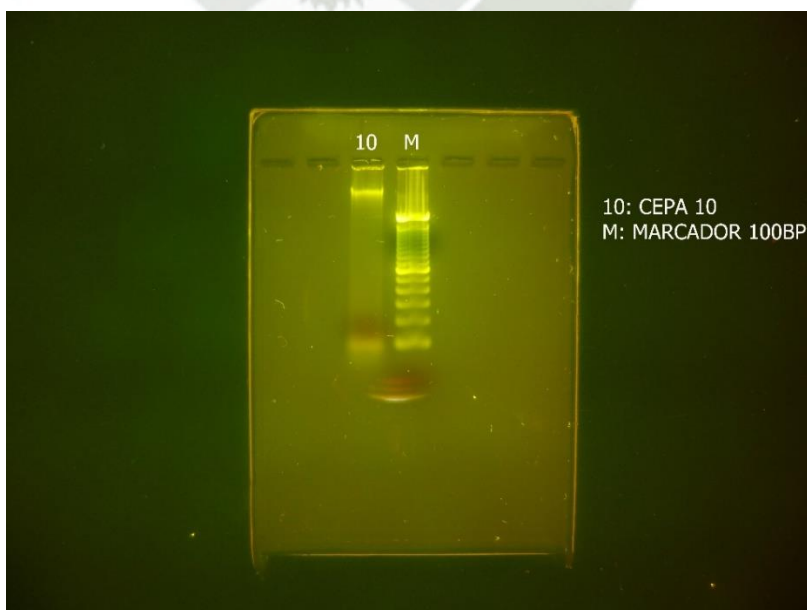


Figura 30. Fotografía de la corrida electroforética donde se confirma la integridad del rRNA 16S de nuestra muestra (10) para la posterior y adecuada secuenciación.

El gen extraído muestra bandas bastante marcadas lo que significa que no se degradó durante el procedimiento de extracción e indicó la integridad en la que se obtuvo el rRNA 16S

El gen purificado obtenido de la extracción del ADN se envió al Departamento de Biología Molecular en el Massachusetts General Hospital, Boston, Estados Unidos (MGH DNA Sequencing Core Facility) en convenio con el Instituto de Biotecnología del ADN Uchumayo, para su secuenciación (anexo 3).

Las secuencias de rRNA 16S obtenidas son las siguientes:

Secuencia REVERSE del rRNA 16S de la bacteria aislada.

>BacteriaPiHG_1492R TRIM QUALITY: 20

```
CCGtCCCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGAGCAACCCACTCCCATGTGTGACGG
GCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTGACATTCTGATTCACGATTACTA
GCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTT
ATGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGGCAACCCTTTGTACCGACCATTGTAGCACGT
GTGTAGCCCTGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTT
TGTCACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATTACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGG
GTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCAT
GCAGCACCTGTGTCTGAGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCAGCA
TGTC AAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCT
TGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTA CTCCCCAGGCGG
TCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAGTTCTCAAGGAACCCAACGGCTAGTTGAC
ATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGTTTTGCA
CCTCAGTGTCAGTATCAGTCCaggtGGTGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTA
CGCATTTACCGCTACACAaggaaattCCACCACCCTCTACCGTACTCTAGCTCG
```

Secuencia FORWARD del rRNA 16S de la bacteria aislada.

>BacteriaPiHG_27F TRIM QUALITY: 20

```
CAGTCGAGCGGATGaaGGGAGCTTGCTCCCTGATTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATG
CCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTTCCGAAAGGAACGCTAATACCGCAT
ACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTGCGCTATCAGATGAGCCTAG
GTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTA ACTGGTC
TGAGAGGATGATCAGTCACACTGGA ACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGC
```

AGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGT
GAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAACTAAT
ACGTTAGTGTTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGC
CGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGT
AGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCCAA
AACTGGCGAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATG
CGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGATACTGACA
CTGAGGTGCGAAAGCgtggggagcaacaGGAttAGAtaccTgGTAGTCCACGCCgTanaCGATGT
C

Una vez ancladas con CAP3 usando UGENE, la secuencia completa fue introducida a la base de datos del GenBank, usando la opción BLAST, en donde se seleccionó todas las secuencias que nos aparecieron, ya que todas presentan entre el 99 y 100% de similitud, después de alinearlas se realizó su análisis filogenético con el programa MR BAYES el árbol obtenido se visualizó usando Figtree 1.4.1 y es la figura 31.

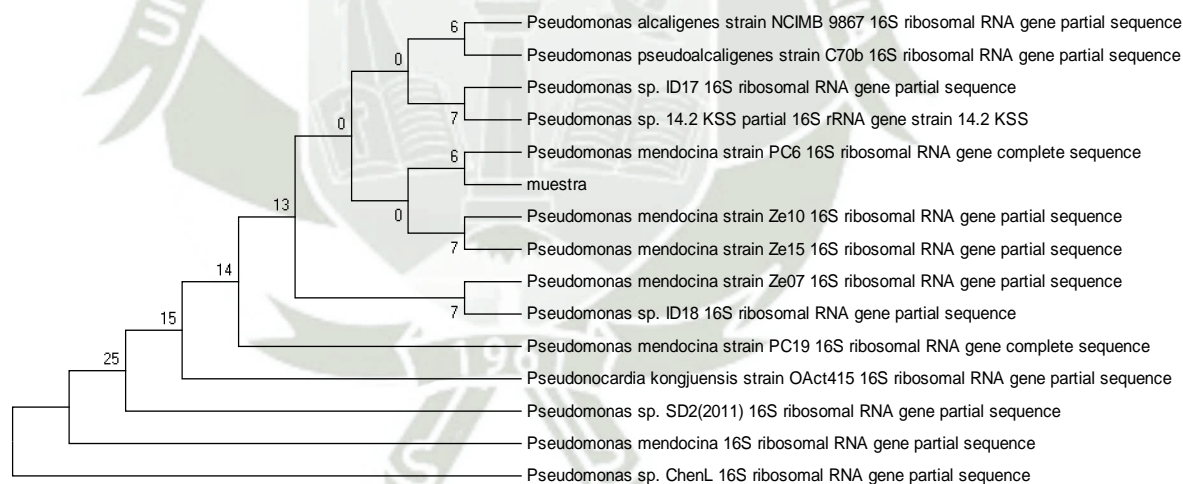


Figura 31. Árbol filogenético de la muestra bacteriana aislada.

En esta figura, se observa que nuestra bacteria aislada corresponde efectivamente a una *Pseudomona*, y tiene una relación con la bacteria *Pseudomona mendocina strain PC6 16S*.

Esta bacteria tiene su código de acceso en el GenBank, con número DQ178222.1, en donde encontramos la información acerca de ésta bacteria, en donde según Merima, un grupo de bacterias del género *Pseudomonas* (en total 38) fueron aisladas para degradar fenol y p-cresol

de aguas residuales vertidas en un río en Estonia, estos grupos de bacterias fueron aisladas y comparadas filogenéticamente, en esta investigación encontraron que distintos tipos género *P. mendocina*, degradan compuestos de fenol y p-cresol vía catabólica catecol *meta* (tipo *meta-meta*) ya que estas bacterias contienen los genes C230, el cual codifican una enzima para la degradación de compuestos aromáticos¹⁰¹.

El total de bacterias que fueron comparadas para construir el árbol filogenético de la bacteria aislada se encuentra en el anexo 4.

3.6. Determinación de la cinética de crecimiento de *Pseudomona* aislada.

Se realizó el conteo celular, cada 3 horas, del cultivo de *Pseudomona* (Figura 32). Los resultados expresados en una curva de crecimiento ploteando número de células vs tiempo, se muestran en la figura 33. Los datos del conteo bacteriano se encuentran en el Anexo 5.

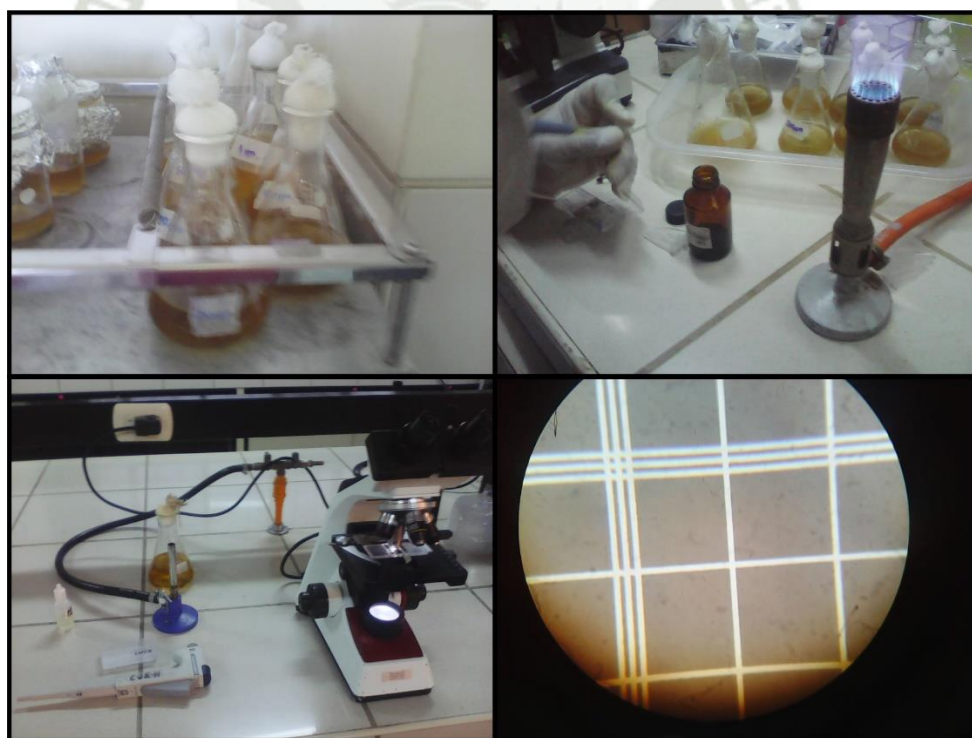


Figura 32. Galería fotográfica del conteo celular en cámara de Neubauer.

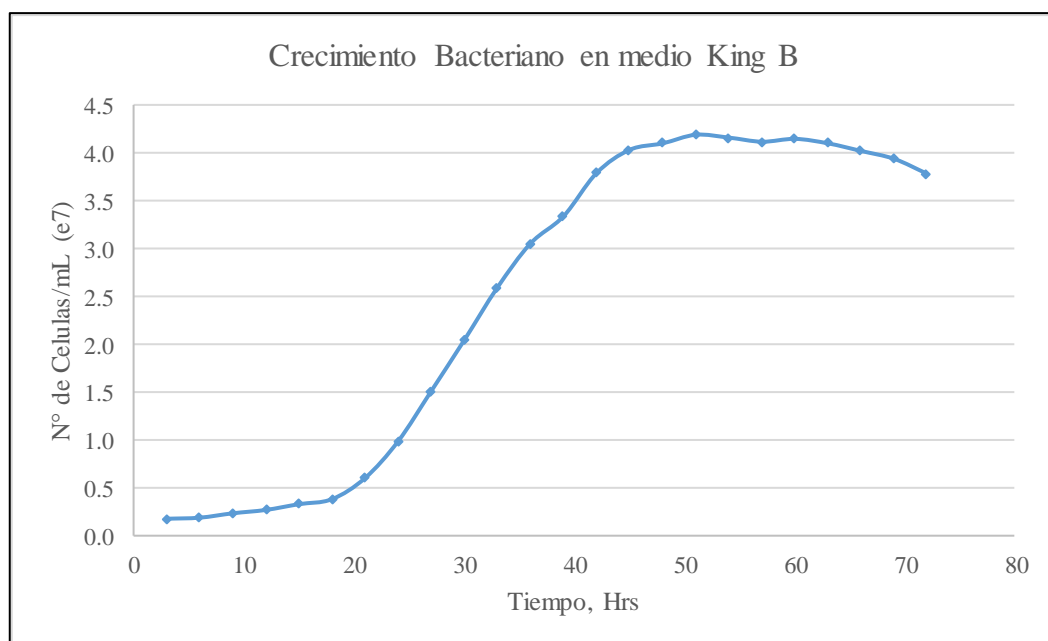


Figura 33. Curva de crecimiento bacteriano en cultivo de *Pseudomona sp.*

Teniendo en cuenta estas premisas, se calculó la constante de crecimiento específico μ , representado en la figura 34. Este valor es $0.0982h^{-1}$.

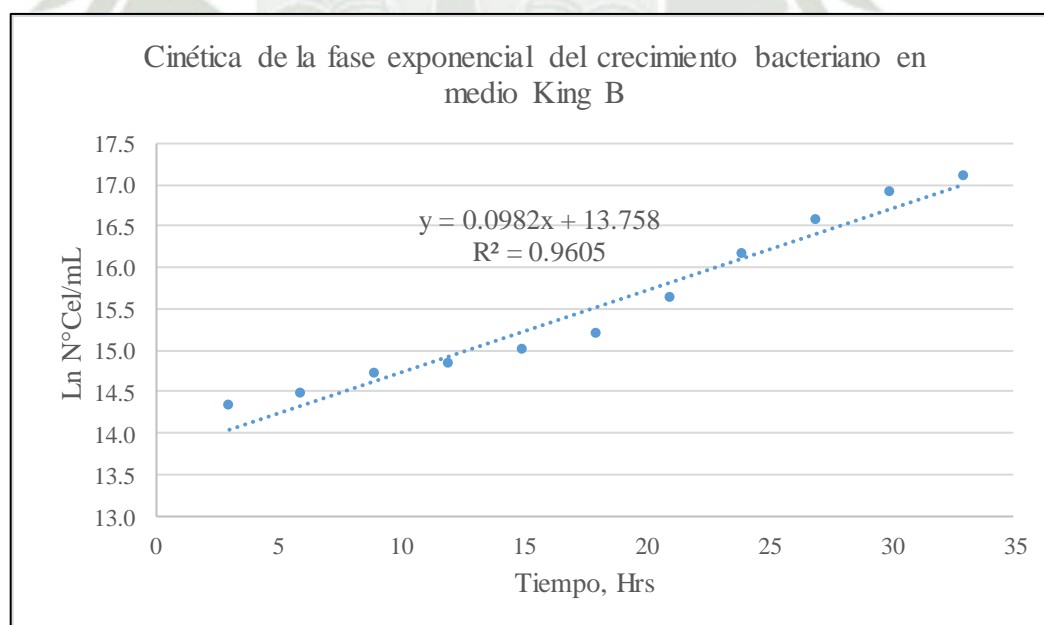


Figura 34. Normalización de la fase exponencial de la curva de crecimiento bacteriano en cultivo de *Pseudomonas sp.*

Para hallar la velocidad de crecimiento de la bacteria en fase exponencial, expresada en tiempo de duplicación, se utilizó la ecuación 3, donde, reemplazando el valor de constante

de crecimiento (μ) obtenido mediante una ecuación exponencial y representado gráficamente, podemos hallar el tiempo de generación, el cual es de 7.06 horas, lo que quiere decir que nuestra bacteria se duplica cada 423.6 minutos.

Posteriormente usamos el modelo logístico para predecir mediante los datos experimentales el comportamiento del crecimiento de la bacteria, basándonos en esta premisa, introducimos los valores en una hoja Excel y realizamos un análisis en regresión no lineal, con la función Solver, la cual nos dio como resultados la figura 35. Los datos del cálculo en Solver se encuentran en el anexo 6.

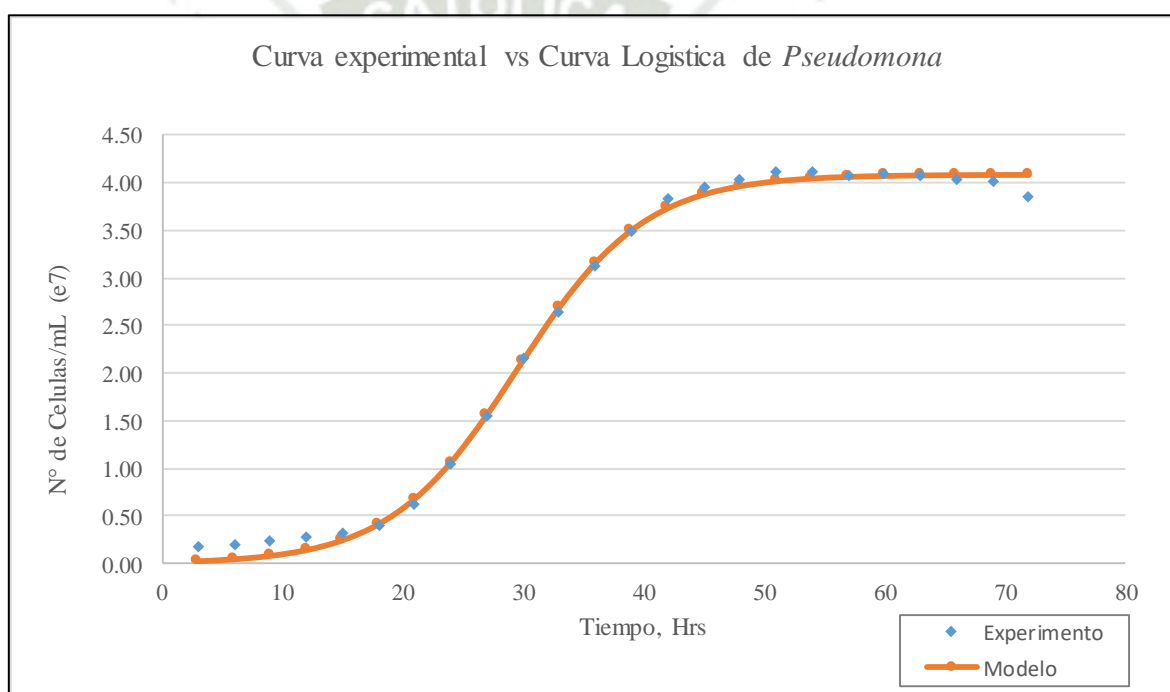


Figura 35. Modelamiento del crecimiento bacteriano según el modelo logístico.

Podemos observar en este gráfico, la curva de color naranja, que simboliza los datos obtenidos según la ecuación 5, en donde también se obtuvo los parámetros:

- a: 23.25
- b: 29.55
- z: 4.09×10^7

Reemplazando los datos en la ecuación 5, obtenemos como modelo matemático para el crecimiento de la *Pseudomona* inoculada en medio King B a 37°C, la siguiente ecuación (6).

$$Y = \frac{4.09 \times 10^7}{1 + e^{\frac{-\ln 81}{23.25} * (t - 29.55)}} \quad (6)$$

Con estos valores, se dedujo que el momento en que empieza el momento de crecimiento exponencial es a las 23.25 horas, el punto de inflexión se da a las 29.55 horas y el valor de bacterias en crecimiento máximo es de 4.09×10^7 cel/mL.

3.7. Determinación de la cinética de crecimiento de *Pseudomona* aislada en laboratorio en concentraciones distintas de mercurio.

Obtenidos los datos del conteo bacteriano para cada concentración de mercurio, se graficó las curvas del crecimiento para cada prueba, esto se observa la figura 36. Los datos del conteo experimental los encontramos en el anexo 7.

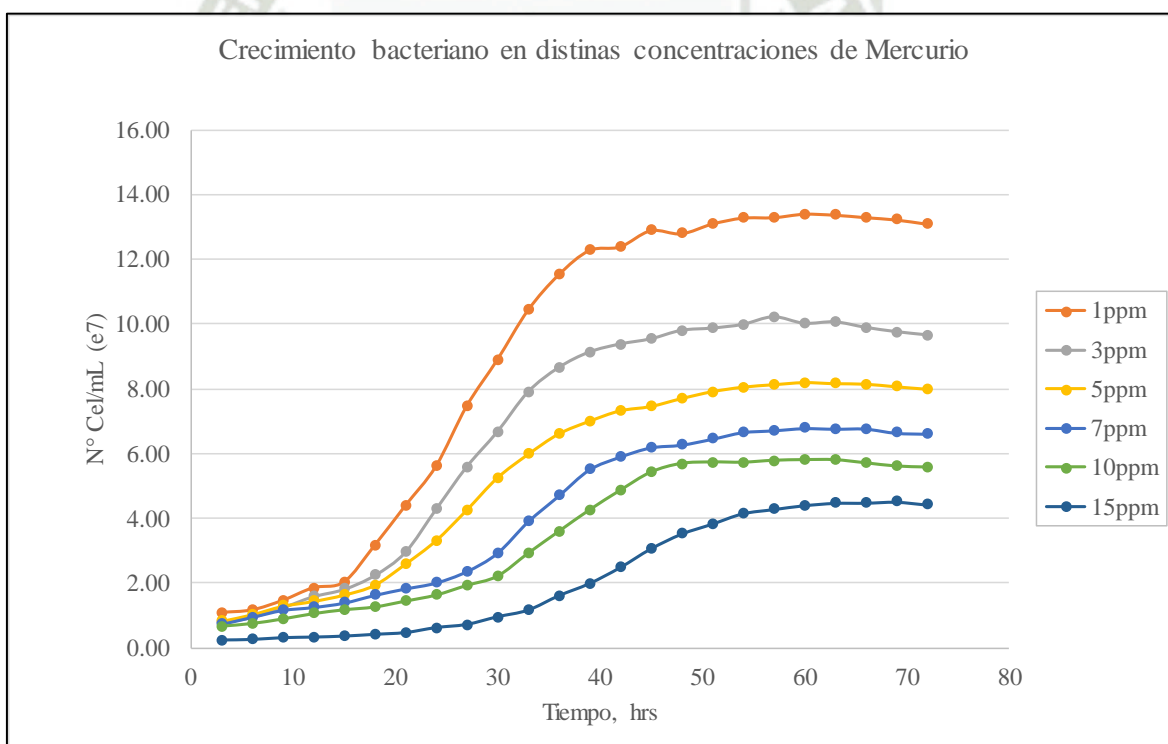


Figura 36. Curvas de crecimiento de cultivo de *Pseudomona* en diferentes concentraciones de Hg en medio King B

En el grafico 36, se observa que a medida que aumenta la concentración de Mercurio, la curva de crecimiento de la bacteria aislada se hace más pequeña, quiere decir que el número

de bacterias disminuye en su fase de estacionaria. Esto puede deberse a la saturación del medio King B con el mercurio presente que afecta al crecimiento de la bacteria.

Por cada prueba, se evaluó el comportamiento de pH en relación del tiempo, por cada concentración de mercurio aplicado, lo que se muestra en la figura 37, en donde se observa que el pH en general se inició a un valor neutro de 7 ± 0.2 en todas las experimentaciones, en el control se empezó con un valor de 7.79, al final de la experimentación (72 horas), se presentó un ligero descenso del nivel de pH, pero no significativo, lo cual indicó que no existe mayor relación el nivel de pH con el crecimiento de la bacteria analizada con la concentración de mercurio aplicada. Los datos de estos valores de pH se encuentran en el anexo 8.

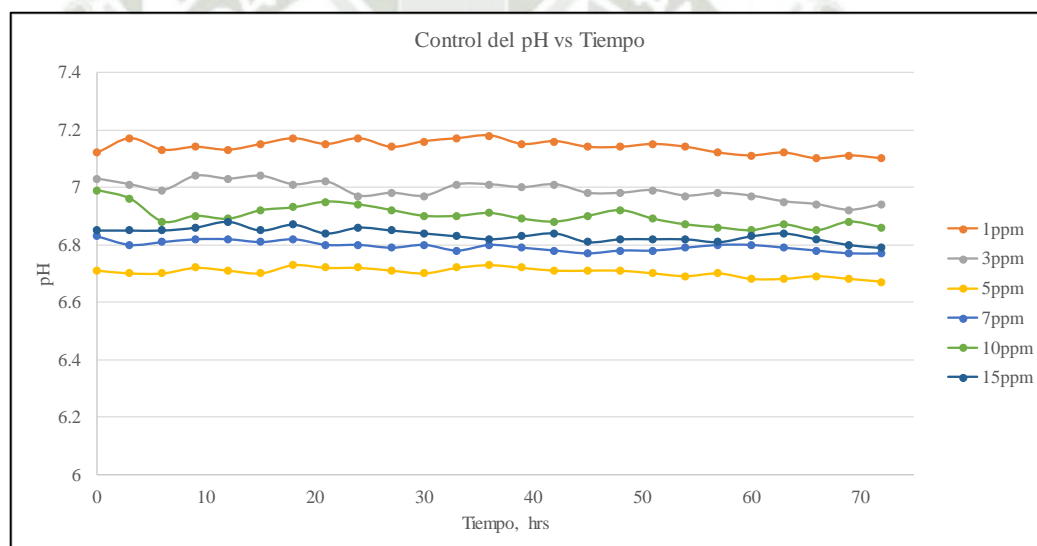


Figura 37. Control del pH en las distintas concentraciones de mercurio con cultivo de *Pseudomona*.

Se calculó también la velocidad de crecimiento bacteriana, basado en el tiempo de duplicación según la ecuación 3, los datos obtenidos los vemos en la tabla 6, donde se observó que el tiempo de duplicación expresado en horas aumenta a medida que aumenta la concentración de mercurio, esto quiere decir que la bacteria se demora más en reproducirse a medida que aumenta la concentración de este metal, lo que provoca que demore en alcanzar su máximo punto en fase estacionaria.

Tabla 6. Tiempo de Duplicación bacteriana de *Pseudomonas*

Concentración Hg	Tiempo de Duplicación, h
1ppm	8.19
3ppm	8.69
5ppm	10.54
7ppm	13.09
10ppm	13.61
15ppm	11.12

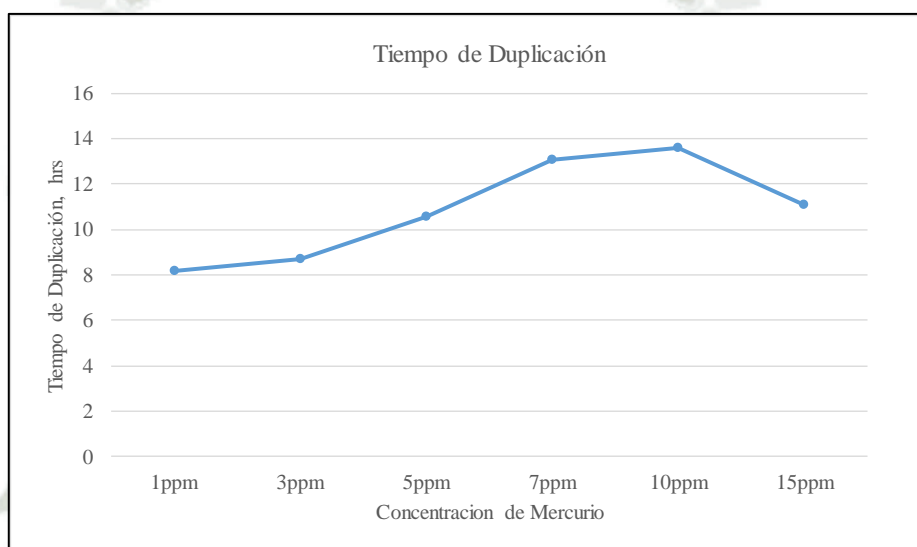


Figura 38. Gráfico del tiempo de duplicación de la bacteria en distintas concentraciones de mercurio.

En la figura 38, se observa gráficamente los datos de la tabla 5, donde visualizamos que el tiempo de duplicación se incrementa a medida que aumenta la concentración de mercurio también aumenta, excepto para la última concentración la cual decae ligeramente.

Se utilizó el modelo logístico (ecuación 5) también para conocer la cinética de crecimiento de *Pseudomona* en las distintas concentraciones de Hg, esto se observa en la figura 39, en donde se observó igualmente que la concentración bacteriana disminuye conforme se aumenta la cantidad de Hg. Los parámetros obtenidos por estos datos se observan en la tabla 6 tanto para los valores de a, b y z.

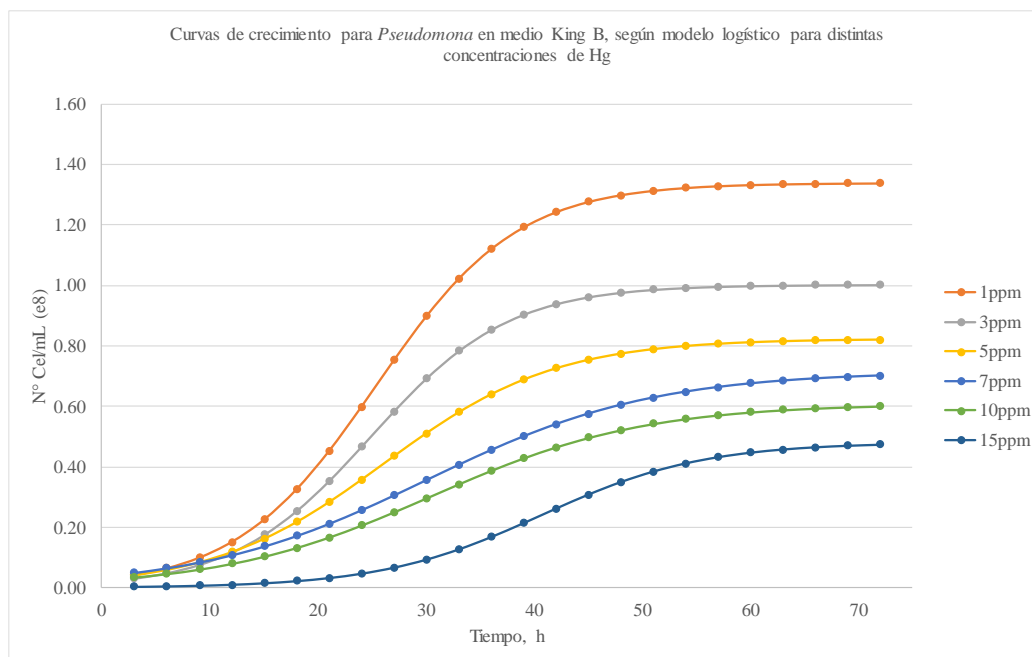


Figura 39. Cinética de crecimiento de cultivo de *Pseudomona* en diferentes concentraciones de Hg en medio King B, según el modelo logístico aplicado.

Los parámetros para el modelo logístico de acuerdo a cada concentración de mercurio aplicado, se observan en la tabla 7.

Tabla 7. Valores de los parámetros del modelo logístico aplicado al crecimiento de *Pseudomona*.

parámetros	Concentración de Mercurio					
	1ppm	3ppm	5ppm	7ppm	10ppm	15ppm
a	28.58	28.05	34.83	46.04	42.95	32.79
b	25.37	24.89	26.08	30.06	30.56	40.64
z	1.34×10^8	1.00×10^8	8.23×10^8	7.15×10^8	6.09×10^7	4.80×10^7

Con estos parámetros obtenidos, se observó que el punto de inflexión de las curvas de crecimiento cada vez es mayor, a medida que aumenta la concentración de mercurio en el medio, además el punto de saturación celular también se ve afectado por la concentración de mercurio en el medio.

Con este modelo logístico podemos determinar el tiempo de duplicación de la cepa a medida que aumenta la concentración de mercurio total y en cualquier concentración, lo que nos ayudara en posteriores análisis.

3.8. Determinación de la capacidad de remoción de mercurio total, usando la cepa aislada *Pseudomona* mediante un BRLF.

Para la configuración del biorreactor con las perlas de alginato de calcio, se eligió realizar la experimentación de remoción de mercurio con la bacteria aislada, usando una concentración de 5ppm de mercurio a partir de un stock de Nitrato de Mercurio (figura 40).

El biorreactor lecho fluidizado, se configuró manteniendo las siguientes variables constantes:

- Temperatura: 37°C
- Flujo: 25 mL/min
- pH: 7±0.2
- Tiempo: 72 horas



Figura 40. Galería fotográfica de la configuración experimental del lecho fluidizado.

La primera experimentación con una solución sintética, donde se incluye la solución stock de mercurio. Se realizó por triplicado la experimentación, tanto para análisis con *Pseudomonas* atrapadas en perlas de alginato y otro para análisis con perlas, pero sin *Pseudomonas* (blanco), todos los análisis se realizaron en el laboratorio de control de

calidad de la UCSM mediante ICP. Todos los resultados las mediciones en ICP se encuentran el anexo 13. Los datos obtenidos fueron los siguientes mostrados en la tabla 8:

Tabla 8. Resultado de las concentraciones de Mercurio total en la experimentación con solución sintética de 5ppm de Hg.

Concentración de Mercurio total, ppm		
Inicial	A	A+P
4.150	3.191	0.704
5.036	4.325	0.961
5.132	3.892	0.753

Inicial = Muestra inicial de solución sintética

A = Perlas de Alginato sin bacterias (Blanco) en solución sintética

A+P = Perlas de Alginato con *Pseudomonas* en solución sintética.

Con estos datos se realizó análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa estadístico STATGRAPHICS Centurión v16. Los datos que se obtuvieron se visualizan en la tabla 9, en esta tabla se observó que la razón F, que en este caso es igual a 60.2066, que es el cociente entre el estimado entre grupos y el estimado dentro de grupos es mayor al valor F crítico que es 5.1432 lo que indica que hay una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

El valor P es de 0.0001, el cual es menor que 0.05 también nos indica una diferencia significativa entre las medias de los 3 grupos analizados a un nivel de confianza de 95%.

Tabla 9. Tabla ANOVA con los datos experimentales realizados con solución preparada de Nitrato de Mercurio.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P	Valor crítico para F
Entre grupos	25.6554	2	12.8277	60.21	0.0001	5.1432
Intra grupos	1.27837	6	0.2131			
Total (Corr.)	26.9337	8				

En la figura 41 se observa como varía la concentración de mercurio en la solución sintética, una vez que realizamos la experimentación, inicialmente encontramos un valor de promedio de 4.77267ppm de Hg, una vez realizado la experimentación con las perlas de alginato sin *Pseudomonas* "A" (Blanco), observamos que la concentración dentro de la solución desciende a 3.8027ppm de Hg y realizada la prueba con *Pseudomonas* atrapadas en alginato

“A+P” la concentración de Hg encontrada en la solución fue de 0.806ppm (valores promedios), estos valores quieren decir que existe una evidencia significativa en la captación de mercurio dentro de las *Pseudomonas*, aunque no lleva a reducir completamente la concentración de mercurio en la solución.

La diferencia de Hg que no se encuentra en la solución también es absorbida por el alginato, pero en menor grado.

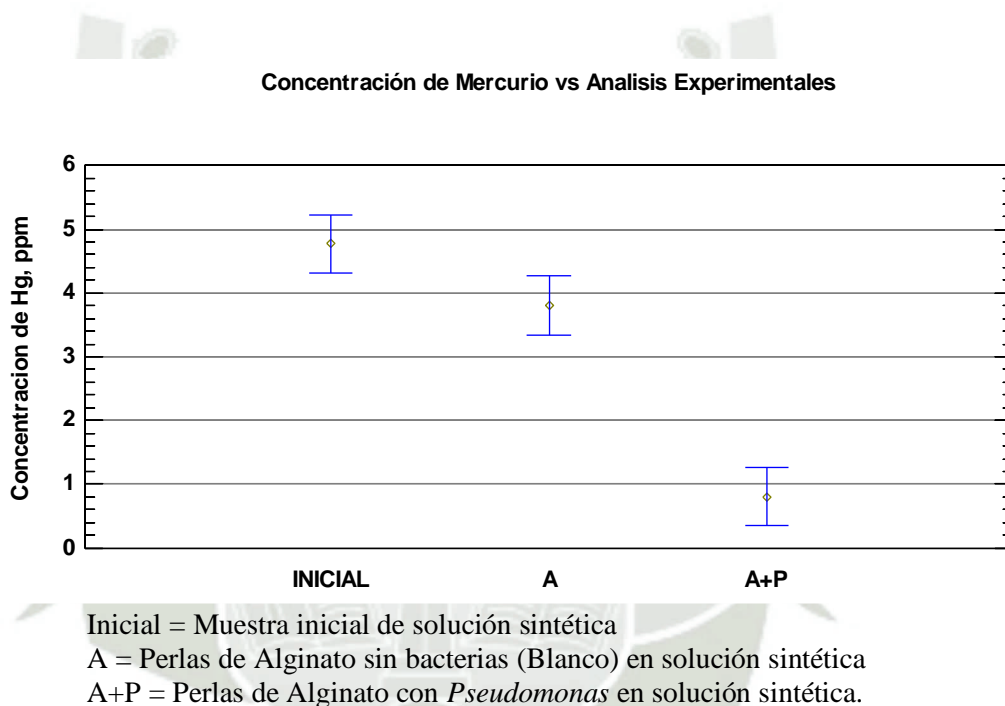


Figura 41. Gráfico comparativo de la concentración de Hg usando *Pseudomonas* atrapadas en alginato y solo con alginato en solución sintética.

Se analizó estadísticamente también por separado las experimentaciones, tomando como datos la concentración inicial de mercurio y la prueba solo con perlas de alginato “A” (blanco) y aparte se analizó la concentración inicial de mercurio y la prueba con *Pseudomonas* atrapadas en perlas de alginato “A+P”, para ello usamos el programa estadístico EXCEL MS.

El resultado del primer comparativo, se realizó una prueba F para determinar si existe diferencia entre las varianzas, el resultado fue de 1.1173 para un valor crítico de 19 (tabla 10) indicándonos que las varianzas son iguales, con este dato se realizó la prueba t, el valor

t experimental es de 2.1327 y crítico es de 2.7764 suponiendo varianzas iguales a un nivel de confianza del 95%.

El valor P que obtuvimos es de 0.0999, el cual, no es menor a 0.05 (tabla 10), quiere decir que no hay diferencia estadísticamente significativa. Estos resultados nos muestran que entre la concentración inicial de Hg y los resultados del análisis después del tratamiento sólo con las perlas de alginato no existe una diferencia estadísticamente en la reducción de mercurio en la solución sintética. Los datos que nos muestra Excel se encuentran en el anexo 9.

Tabla 10. Pruebas F y T para los análisis en solución sintética de 5ppm de Hg.

Pruebas	Valor F	F crítico	Valor T	T crítico	P
Inicial vs A	1.1173	19	2.1327	2.7764	0.0999
Inicial vs A+P	15.7414	19	12.3059	2.7764	0.0003

Inicial = Muestra inicial de solución sintética

A = Perlas de Alginato sin bacterias (Blanco) en solución sintética

A+P = Perlas de Alginato con *Pseudomonas* en solución sintética.

Para el segundo comparativo entre la muestra inicial vs las *Pseudomonas* en alginato, también se realizó la prueba F, para determinar si hay diferencia de varianza, el resultado fue de 15.7414, el valor crítico de F fue de 19 (tabla 10), el cual cae dentro del rango; por lo tanto, no hay diferencia entre las varianzas.

Se realizó la prueba t a un nivel de confianza del 95%, dándonos un valor t de 12.3059, siendo el valor crítico de 2.7764 (tabla 10), el valor P es de 0.0003, siendo menor de 0.05, con estos datos podemos aseverar que si hay diferencia estadísticamente significativa entre la muestra inicial y la prueba realizada con las *Pseudomonas* atrapadas en alginato para la reducción de Hg en la solución sintética. Los datos obtenidos de este análisis en Excel se encuentran en el anexo 10.

Los resultados de la tabla 10, nos muestra que, usando las células inmovilizadas en alginato de calcio, tiene una eficiencia del 83.11%; en cambio, usando las perlas de alginato de calcio sin células, tiene una eficiencia del 20.32%.

Se reportó otros trabajos usando Enterobacterias en donde el mercurio fue removido de la solución sintética conteniendo 5 mg/L de HgCl_2 , en 72 h.

En porcentajes, la reducción de mercurio sin bacterias fue de 20.32%, en cambio utilizando las bacterias fue una reducción de 83.11%.

La segunda experimentación fue usando el relave, extraído de los quimbaletes, de las mineras informales de extracción de oro usando mercurio, en la localidad del Pedregal Caylloma, se realizó el diseño experimental con la solución stock de mercurio.

Se realizó las experimentaciones por triplicado, el análisis de mercurio total se analizó en el laboratorio de control de calidad de la UCSM mediante ICP, los resultados se muestran en la tabla 11, tanto para la experimentación con perlas de alginato como con las *Pseudomonas* encapsuladas.

Tabla 11. Resultado de las concentraciones de Mercurio total en la experimentación con relave.

Concentración de Mercurio total, ppm		
Inicial_r	A_r	A+P_r
0.421	0.367	0.358
0.401	0.333	0.201
0.387	0.304	0.234

Inicial_r = Muestra inicial de relave

A_r = Perlas de Alginato sin bacterias (Blanco) en relave

A+P_r = Perlas de Alginato con *Pseudomonas* en relave

Tenemos que resaltar que el valor inicial de mercurio total en la muestra de relave, es de promedio 0.403ppm, este valor es mucho mayor, es mayor que el permitido según el D.S. para límites máximo permisibles en industrias mineras el cual es de 0.002ppm (anexo 1)

Según los datos de la tabla 11, indica que la experimentación con las células inmovilizadas en alginato de calcio tuvo una eficiencia del 42.67%, y usando las perlas de alginato sin células, tuvo una eficiencia del 16.95%.

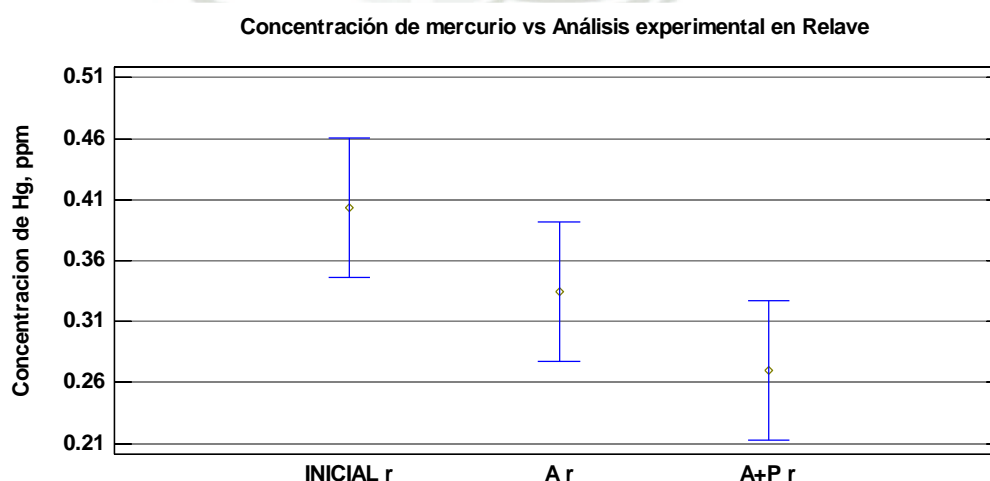
Se realizó análisis ANOVA, con el programa estadístico STATGRAPHICS Centurión v16, para los tres grupos, los datos que podemos obtenemos se muestran en la Tabla 12, donde la razón F es 32.06, cuando el valor crítico es de 5.1433, además el valor P obtenido es de 0.0006 el cual es menor que 0.05, estos resultados indican que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 3 varianzas con un nivel del 95% de confianza.

Tabla 12. Tabla ANOVA con los datos experimentales realizados con muestra de relave.

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P	Valor crítico para F
Entre grupos	0.0450	2	0.0225	32.06	0.0006	5.1433
Intra grupos	0.0042	6	0.0007			
Total (Corr.)	0.0492	8				

En la figura 42, se comparó los resultados del análisis experimental, en donde la muestra inicial de relave de mercurio tiene un valor promedio de 0.403ppm de Hg total, la prueba usando perlas de alginato, se obtuvo un valor de 0.3347ppm de Hg resultante en el relave y finalmente en la prueba usando *Pseudomonas* atrapadas en alginato, el valor final de mercurio fue de 0.231ppm.

En esta figura, se observó que existe disminución de mercurio en la muestra de relave después de realizar la experimentación tanto con alginato como *Pseudomonas* atrapadas en alginato.



Inicial_r = Muestra inicial de relave
 Ar = Perlas de Alginato sin bacterias (Blanco) en relave
 A+P_r = Perlas de Alginato con *Pseudomonas* en relave

Figura 42. Comparativo de la concentración de Hg en relave usando alginato vs *Pseudomonas* atrapadas en alginato.

Para determinar si existe una diferencia relacionando la muestra inicial con la muestra usando alginato de calcio y por separado con las *Pseudomonas* atrapadas en alginato, se realizó las pruebas F y t, respectivamente tal como se realizó con la experimentación con solución sintética.

La primera comparativa se realizó con la muestra inicial de relave vs las perlas de alginato, el valor de la prueba F para determinar varianzas iguales o diferentes, devolvió un valor de 3.4053 frente a un valor crítico de 19, a un nivel de confianza del 95%, esto indica que no existe diferencia significativa por lo que las varianzas son iguales, entonces se realizó la prueba t, para dos muestras con varianzas iguales, el valor t experimental fue de 3.3 mayor que el valor t crítico que es de 2.7764 (Tabla 13), mientras que el valor P indica 0.0299 a un 95% de nivel de confianza, este valor es menor que 0.05 (Tabla 13). Estos datos indican que hay una diferencia estadísticamente significativa para dos grupos de muestras analizados. Los resultados obtenidos en Excel se muestran en el anexo 11.

Tabla 13. Pruebas F y T para los análisis en muestra de relave.

Pruebas	Valor F	F crítico	Valor T	T crítico	P
Inicial _r vs A _r	3.4053	19	3.3000	2.7764	0.0299
Inicial _r vs A+P _r	2.8048	19	8.9378	2.7764	0.0009

Inicial_r = Muestra inicial de relave

A_r = Perlas de Alginato sin bacterias (Blanco) en relave

A+P_r = Perlas de Alginato con *Pseudomonas* en relave

En el análisis entre la muestra inicial vs la muestra usando *Pseudomonas* atrapadas en alginato, se obtuvo como resultado de valor F 2.8048 siendo el valor crítico 19 (Tabla 13), a un 95% de nivel de confianza, lo que indica que no existe diferencia de varianzas, entonces se realizó la prueba t, suponiendo varianzas iguales para dos muestras, donde el valor T fue de 8.9378 frente a un valor crítico de 2.7763, y un valor P de 0.0009 (Tabla 13) a un 95% de nivel de confianza, estos resultados indican que si existe una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de muestras analizados, ya que el valor T es superior al valor crítico, y el valor P es menor a 0.05. Los resultados de los análisis en Excel se encuentran en el anexo 12.

Según Sinha, uso las enterobacterias para remover mercurio de efluentes industriales en donde reporta que después de una concentración inicial de 7.3 mg/L de mercurio, éste fue removido completamente después de 72 h⁴⁶.

En porcentajes la reducción sin bacterias fue del 16.96% y con las bacterias fue del 34.41%.

Además, la prueba que se realizó para comprobar la precipitación de mercurio (Hg^{2+}) con el cambio de pH, en donde el stock de nitrato de mercurio a 5ppm, tuvo un valor de pH de 1.027, cuando el valor de pH fue de 2.412, el stock de nitrato de mercurio fue presentando una ligera turbidez, esto se debe a que la especie presente en el medio paso de Hg^{2+} a Hg^0 el cual es insoluble y precipita, tal como se muestra en los diagramas de Pourbaix.

Esto es fundamental para saber el accionar de la bacteria aislada frente al mercurio en sus diferentes estados; por lo tanto, con estos resultados podemos indicar, que en el medio de cultivo con stock de 5ppm de nitrato de mercurio, no tenemos necesariamente la presencia de Hg^{2+} , si no el mercurio en forma elemental, entonces la disminución del mercurio en el medio se podría deber principalmente a la bioacumulación del mercurio sea en la matriz del alginato de calcio o de la bacteria, según Barkay y Hobman, en su experimentación, la acumulación de mercurio dentro del citoplasma indico que el proceso de reducción de Hg^{2+} a Hg^0 se ve alterado y fue convertido nuevamente a Hg^0 a través de algunas proteínas celulares o algún mecanismo alterno.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES

PRIMERO. - La remoción de mercurio en relaves mineros precedentes de la extracción de oro, mediante la utilización de *Pseudomonas spp*, si presenta evidencia estadística significativa usando una matriz o encapsulamiento de las bacterias, sin embargo, no podemos determinar molecularmente la captura o síntesis de Mercurio, dentro de la matriz o bacteria.

SEGUNDO. - Se aisló e identificó bioquímicamente una bacteria del género de las *Pseudomonas* aislada a partir de relave minero proveniente de chancadoras informales de extracción de oro, mediante el uso de medios de cultivo generales y específicos. Posteriormente se identificó molecularmente y caracterizó filogenéticamente la bacteria aislada obteniendo que la bacteria es una *Pseudomona mendocina strain PC6 16S* que se puede ubicar en la base de datos del GenBank con número de acceso DQ178222.1, esta bacteria fue estudiada para otras investigaciones para degradar fenol y p-cresol.

TERCERO. - Se logró construir un modelo logístico para predecir el comportamiento del crecimiento de la cepa bacteriana aislada, determinando los parámetros cinéticos de crecimiento expresados en tiempo de duplicación, estos fueron 7.06, 8.19, 8.68, 10.54, 13.09, 13.61, 11.12 horas de duplicación en pruebas de 0, 1, 3, 5, 7, 10 y 15ppm de mercurio respectivamente.

CUARTO. - Se configuro experimentalmente un BRLF con células de *Pseudomona* aisladas e inmovilizadas en alginato de calcio, para la remoción de mercurio total en dos muestras, un relave minero aurífero y una solución sintética conteniendo mayor concentración de mercurio total.

QUINTO. - Se determinó que la remoción de mercurio en solución sintética conteniendo 5 ppm de Hg, mostró que, si existe diferencia estadísticamente significativa, obteniendo un valor P de 0.0001 que es menor a 0.05. Además, se compararon cada grupo por separado (muestra inicial vs perlas de alginato (Blanco) y muestra inicial vs *Pseudomonas* atrapadas

en alginato), en donde el blanco mostró un valor P de 0.0999 que indica que no existe diferencia significativa de remoción de mercurio frente a la muestra inicial, en cambio para la experimentación con *Pseudomonas* atrapadas en alginato, el resultado del valor P fue de 0.0003 que indica que si existe evidencia estadística que la bacteria puede capturar o retener el mercurio de una solución conteniendo este metal, en porcentaje se obtuvo que la reducción de mercurio fue de 20.32% para blanco y 83.11% usando bacterias. El mismo análisis se efectuó para la muestra de relave, en donde nos dio un valor de 0.403 ppm de Hg total, el análisis de varianza aplicada a las muestras fue un valor P de 0.0006, refiere que, si hay diferencia entre las experimentaciones, en la comparación entre la muestra inicial y las perlas de alginato (blanco), tenemos un valor P de 0.029 que indica que, si existe una diferencia significativa estadísticamente. Para la comparación entre la muestra inicial de relave y las *Pseudomonas* atrapadas en alginato, el valor P fue de 0.0009, que nos indica que si tenemos diferencia significativa en los resultados obtenidos tras la experimentación. En porcentaje se obtuvo que la reducción de mercurio fue de 16.96% para blanco y 34.41% usando bacterias.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la aplicación de un BRLF conteniendo Bacteria de *Pseudomonas sp.* atrapadas en perlas de alginato de calcio reduce significativamente la concentración de Hg total en la muestra recirculante, confirmando parcialmente la hipótesis inicial, pero no llega a depurar completamente dicha concentración hasta llegar a los parámetros permitidos por la legislación peruana.

SUGERENCIAS

Realizar otras investigaciones para perfeccionar la metodología para la formación de perlas de alginato e inmovilización de bacterias.

Experimentar con otros proyectos para comparar el BRLF con otros biorreactores para determinar si la configuración de estos influye en la disminución de la concentración del Mercurio en el medio en estudio.

Realizar experimentaciones para determinar el mecanismo por el cual la bacteria es capaz de disminuir la concentración de Mercurio en el medio en estudio.



REFERENCIAS

1. Leonard, A., Jacquet, P., y Lauwerys, R.R. Mutagenicity and teratogenicity of mercury compounds. *Mutat. Res.* 1983. 114(1):1-18.
2. Guerrero, JJ., Ortiz Z. Bioremediación de cianuro y mercurio en minería aurífera; JOSCAJD Prensa & Comunicaciones (eds). 2010. p200.
3. Evelia M. Estudio de la reducción de Mercurio (Hg^{2+}) por *Pseudomonas sp.*, CINVESTAV-IPN. 2012. p5.
4. Llivisaca S.A., Vargas J.D. & Burgos F. 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, Escuela Superior Politécnica del Litoral, Ecuador. 2005. pp.1-7.
5. Vullo D. Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Revista Química viva*, Buenos Aires. Argentina. 2003.
6. Rice K., Walker E., Wu M., Gillete C. & Blough E. Environmental mercury and its toxic effects. *J Prev Med Public Healt.* 2014. pp47:74-83.
7. Gaona X. El mercurio como contaminante global. Desarrollo de metodologías para su determinación en suelos contaminados y estrategias para la reducción de su liberación al medio ambiente. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. 2004.
8. Weinberg J. Introducción a la contaminación por mercurio para las ONG. Editorial IPEN. 2010.
9. Hernández M. Aislamiento y Caracterización de bacterias resistentes a mercurio de suelo de Idrija, Eslovenia. Universidad Autónoma de Querétaro. Querétaro. 2013. pp 1-5.
10. Morita M. Y., Edmondst. J. "The determination of mercury species environmental and biological samples" *Pure & Applied Chemistry.* 1998. Pp 1585-1615.
11. Barkay T., Wagner-Dobler I. Microbial Transformations of Mercury: Potentials, Challenges, and Achievements in Controlling. *Mercury Toxicity in the Environment. Advances in applied microbiology.* 2005. pp 2-40.
12. Ming-Ho Yu. Environmental toxicology: impacts of environmental toxicants on living systems. Ed. Lewis. 2001. p255.
13. UNEP, United Nations Environment Programme. Chemicals. "Global mercury assessment." 2002. pp.24-29.
14. Pilon E, Pilon M. Breeding mercury-breathing plants for environment clean-up. *Trends in plant sciences.* 2000. pp235-236.

15. Nriagu J.O., Pfeiffer W.C., Malm O., Magalhaes de Souza C.M., y Mierle G. Mercury pollution in Brazil. *Nature*. 1992. pp356(6368):389.
16. Hanisch C. Where is mercury deposition coming from *Environ. Sci. Tech.* 1998. pp32(7):176 A-179A.
17. Turizo A., Vargas A., Jiménez M., Villamil M., Restrepo A., González J., Chávez J., Rincón C., Cardoza G. Plan de manejo ambiental regional para la pequeña minería de oro de aluvión y filón en el Sur del Departamento de Bolívar. Corporación Autónoma Regional del Sur de Bolívar (C.S.B.). Cartagena. 1997.
18. Olivero V. J., Johnson R. B. El lado gris de la minería del oro: la contaminación con mercurio en el norte de Colombia. Universidad de Cartagena. 2002. pp43-45
19. Eto K. Minamata disease. *Neuropathology*. 20:Suppl. 2000. pp14-19.
20. Kondo K. Congenital Minamata disease: warnings from Japan's experience. *J. Child Neurol.* 2000. 15(7):458-464.
21. Japan Public Health Association. Preventive Measures against Environmental Mercury Pollution and its Health Effects. Minamata. 2001.
22. Greenwood M. R. Methylmercury poisoning in Iraq. An epidemiological study of the 1971-1972 outbreak. *J. Appl. Toxicol.* 1985. 5(3):148-159.
23. Elhassani S.B. The many faces of methylmercury poisoning. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 1982. 19(8):875-906.
24. US-EPA, Treatment Technologies for Mercury in Soil, Waste and Water, August 2007.
25. Jan A., Murtaza I., Ali A., Mohd A.Q., Haq R. Mercury pollution: an emerging problema and potential bacterial remediation strategies. *World J Microbiol Biotechnol.* 2009. 25:p1529-1537.
26. The Mercury Policy Project, Reducing global emissions from burning mercury-added products, 2009. p87.
27. PNUMA (Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente), Evaluación Mundial sobre el Mercurio, Ginebra Suiza, junio 2005.
28. Hutchison A.R., Atwood D.A. Mercury pollution and remediation: the chemist's response to a global crisis. *J Chem Crystal.* 2003. 33:pp631-645.
29. Wang J., Feng X., Anderson C.W., Xing Y., Shang L. Remediation of mercury contaminated sites - A review. *J Hazard Mater.* 2012. pp221-222:pp1-18.
30. Brooks, W.E., Sandoval E., Yopez M. y Howard H., Perú Mercury Inventory 2006, U.S. Department of the Interior U.S. Geological Survey. 2007.

31. Jiménez A. Interacción del Mercurio con los componentes de las aguas residuales, Universidad Nacional de Colombia, Manizales. 2005. pp6-15.
32. Rodríguez O., Padilla I., Tayibi H., López-Delgado, A. Concerns on liquid mercury and mercury-containing wastes: A review of the treatment technologies for the safe storage. *J Environ Man*, 2012. p101:pp197-205.
33. Gerhardt K.E., Huang X.D., Glick B.R., Greenberg B.M. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: potential and challenges. *Plant Sci*. 2009. p176: pp20-30.
34. Vara Prasad M.N., Oliveira Freitas H.M. Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electron J Biotechnol*. 2003. 6(3):pp285-321.
35. Rugh C.L., Wilde D., Stack N.M., Thompson D.M., Summers A.O., Meagher R. B. Mercuric ion reduction and resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing a modified bacterial *merA* gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996. 93:3182-3187.
36. Oswald W.J. Micro-algae and waste-water treatment. In: Borowitzka M.A., Borowitzka, L.J. (Eds.). *Micro-algal Biotechnology*. Cambridge University Press. 1988. pp. 305-328.
37. Manuel C.D., Neyra-Tanabe M.E. Mercury uptake of microalgae in Kematu River, T'boli, South Cotabato, Philippines. Trabajo presentado en la 2da Conferencia internacional y 12 conferencia científica anual, Filipinas. 2012.
38. Imani S., Rezaei-Zarchi S., Borna H., Javid A., Zand A., Abarghouei H.B. Hg, Cd and Pb heavy metal bioremediation by *Dunaliella* alga. *J Med Plants Res*. 2011. 5(13):2775-2780.
39. Urgan-Demirtas M., Stark B., Pagilla K. Use of genetically engineered microorganisms (GEMs) for the bioremediation of contaminants. *Crit Rev Biotechnol*. 2006. 26(3):145-164.
40. Huang C.C., Chen M.W., Hsieh J.L., Lin W.H., Chen P.C., Chien L.F. Expression of mercuric reductase from *Bacillus megaterium* MB1 in eukaryotic microalga *Chlorella* sp. DT: an approach for mercury phytoremediation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006. 72(1):197-205.
41. Li K., Ramakrishna W. Effect of multiple metal resistant bacteria from contaminated lake sediments on metal accumulation and plant growth. *J Hazard Mat*. 2011. p189:pp531-539.

42. De Jaysankar & N. Ramaiah. Occurrence of large fractions of mercury-resistant bacteria in the Bay of Bengal; *Current Science*, Vol 91, No. 3, 10 August 2006.
43. Barkay T., Miller S., Summers A. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *Microbiol Reviews.*, 2003. pp355-384.
44. Essa A. M., Macaskie L. E. y Brown N. L. Mechanisms of mercury bioremediation, *Biochemical Society Transactions* 2002, volume 30, part 4. 2002.
45. Paisio C.E., González P.S., Talano M.A. y Agostini E. *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal*. 2012. 3(2):119-146.
46. Sinha A., Khare S.K. Mercury bioaccumulation and simultaneous nanoparticle synthesis by *Enterobacter sp.* cells. *Biores Technol*. 2010. 102:pp4281-4284.
47. François F., Lombard C., Guigner J.M., Soreau P., Brian-Jaisson F., Martino G., Vandervennet M., Garcia D., Molinier A.L., Pignol D., Peduzzi J., Zirah S., Rebuffata S. Isolation and characterization of environmental bacteria capable of extracellular biosorption of mercury. *Appl Environ Microbiol*. 2012. 78:pp1097-1106.
48. Wagner-Döbler I. Pilot plant for bioremediation of mercury-containing industrial wastewater. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2003. 62:pp124-133.
49. Malakahmad A., Hasani A., Eisakhani M., Hasnain M. Sequencing Batch Reactor (SBR) for the removal of Hg^{2+} and Cd^{2+} from synthetic petrochemical factory wastewater. *J Hazard Mater*. 2011. 191(1-3):pp118-125.
50. Hafez N., Abdel-Razek A.S., Hafez M.B. Accumulation of some heavy metals on *Aspergillus flavus*. *J Chem Tech Biotechnol*. 1997. 68:pp19-22.
51. Gadd G.M. Accumulation of metals by microorganisms and algae. In: Rehm HJ, Reed G (Eds). *Biotechnology*, Vol. 6, Weinheim, Germany. 1988. pp 401-430.
52. Kurns L., Roomans G.M. Intracellular localization of heavy metals in yeast by X-ray microanalysis. *Scan Electr Microsc*. 1985. 1:pp191-199.
53. Dash H., Das S. Bioremediation of mercury and the importance of bacterial mer genes. *Inter biodeterioration & biodegradation ELSEVIER*, 2012. 75:207-213.
54. Anzai Y., Kim H., Park JY., Wakabayashi H. Phylogenetic affiliation of the pseudomonas based on 16S rRNA secuence. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2000. 50:1563-89.
55. Anzai Y., Kudo Y., Oyaizu H. The phylogeny of the genera *Chryseomonas*, *Flavimonas*, and *Pseudomonas* supports synonymy of the three genera. *Int J Syst Bacteriol*. 1997. (2):249:51.

56. Migula W. An Introduction to practical bacteriology for physicians, chemists, and students. Introductory science text-books. Ed. S. Sonnenschein. 1983. p247.
57. Cornelis P. *Pseudomonas: Genomics and Molecular Biology*, 1st ed., Caister Academic Press. 2008.
58. Palleroni N. J. “*Pseudomonas* classification. A new case history in the taxonomy of Gram-negative bacteria”, *Antonie van Leeuwenhoek*. 1993. 64, pp231-251.
59. Palleroni N. J. “Human and animal pathogenic *Pseudomonas*. En: *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification and Applications*. A. Ballows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Herder and K. H. Schleifer (Eds.) Springer-Verlang. Nueva York. 1992. p662-676.
60. Jacoby G.A. “Resistance plasmids of *Pseudomonas*. En: *The Bacteria. Vol. X. The Biology of Pseudomonas*. J. K. Sokatch (Ed.) Academic Press, Nueva York. 1986. p265-292.
61. Schoroth M. N., and Hancock J. G. Disease suppressive soil and root colonizing bacteria, *Science* 216. 1982. pp1376-1381.
62. Pino Z. N. “Aislamiento y Adaptación de bacterias silvestres del genero *Acidithiobacillus* en cultivo mixto para su uso en biolixiviación de sulfuros secundarios de cobre en la mina cerro verde, Arequipa.”, UCSM, Arequipa. 2008.
63. Doran, P. M., *Principios de Ingeniería de los Bioprocesos*. University of New South Wales, Sydney, Australia. Editorial Acribia, 1998.
64. McMeekin T. A., Olley, J. Ratkowsky D. A. y Ross T. Predictive microbiology: towards the *Interface and beyond*, *International Journal of Food Microbiology*. 2002. 73:395-407.
65. Fernández P. S., George S. M. Sills C. C. y Peck M. W. Predictive model of the effect of CO₂, pH, temperatura and NaCl on the growth *Listeria monocytogenes* *International Journal of Food Microbiology*. 1997. p37:37-55.
66. Swinnen I. A. M., Bernaerts K., Dens E. J. J. Predictive modelling of the microbial lag phase: a reiew. *International Journal of food Microbiology*. 2004. 94:137-159.
67. Narváez V. & Suarez G. Aislamiento e identificación de bacterias aerobias halófilas con actividad proteolítica procedentes de piscinas de la industria de sal ECUASAL localizada en Santa Elena - Ecuador. Carrera de Ingeniería en Biotecnología. ESPE. Sede Sangolqui. 2007.
68. Bou G., Fernández-Olmos A., García C., Sáez-Nieto J & Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología- España. 2010. p6.

69. Schlegel H. Microbiología General, séptima edición. 1997. p32- 42.
70. Prescott H., Klein. Microbiología, cuarta edición. 1999. pp264 – 283.
71. López G. M., Cárdenas P. M., Osuna M. A. Manual de laboratorio de microbiología para el diagnóstico de infecciones. España. 2007.
72. Rodríguez E. Bacteriología General: Principios y Practicas de Laboratorio. 2005.
73. MacFaddin J. Media for Isolation Cultivation Identification Maintenance of Medical Bacteria, Williams and Wilkins, Baltimore. 1985.
74. Murray P.R. Manual of clinical microbiology. American Society for Mycobiology. Washington D.C. 1999.
75. Brown V.I., Lowbury, E.J.L. Use of an improved cetrimide agar medium and of culture methods for *Pseudomonas aeruginosa* J. Clin. Pathol. 1965. 18: 752
76. Rodríguez M. Aislamiento y selección de cepas del género *Lactobacillus* con capacidad probiótica e inmunomoduladora. Tesis doctoral. Madrid. Universidad Complutense de Madrid. 2009.
77. Kumar S., Filipski A. Molecular Phylogeny Reconstruction. 2001.
78. Aguilar JM. Especiación recombinacional y relaciones filogenéticas en *Satureja macrostema* vr. *Leavigata*. Universidad de Colima. México. 2002.
79. Wiley E.O. The evolutionary species concept reconsidered. 1981. p. 17-26
80. Swofford, D.L. Molecular Systematics, eds Hillis, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 1996. p407-514
81. Arroyo M. Immobilized enzymes: theory, methods of study and applications. En: *Ars Pharmaceutica*. 1998. 39 (2): 23-39
82. Naranjo J., Santa María M. Evaluación de la Inmovilización de *Pseudomonas fluorescens* para la biodegradación de cianuro en solución acuosa. Universidad EAFIT, Medellín, Colombia. 2006. p25-29.
83. Akzu Z, Egretli G, Kutsal T. A comparative study for the biosorption characteristics of chromium (VI) on Ca-alginate, agarose and immobilized *C. vulgaris* in a continuous packed bed column. En: *J. Environ. Sci Health*. 1999. 34: 295-316
84. Scragg A.H. Células y enzimas inmovilizadas. En: *Biotecnología para Ingenieros, Sistemas biológicos en Procesos tecnológicos*. Editorial Limisa. 2000. pp 243-261
85. Jerabkova, H. y Kralova, Y. Absorción y biodegradación de n-alcanos. En: *Revista de Ingeniería Química*. 1999. pp487-492.

86. Godjevargova T., Ivanova D., Alexieva Z. y Dimov N. Biodegradation of toxic organic components from industrial phenol production waste waters by free and immobilized *Trichosporon cutaneum* R57. *Process Biochemistry*. 2003. 38, 915-920.
87. Hanaki K., Hirunmasuwana S., y Matsuo T. Protection of methanogenic bacteria from low pH and toxic materials by immobilization using polyvinyl alcohol. *Water Research*. 1994. 28, 877-885.
88. Zhang Y., Ma, Y., Yang F. Zhang Ch. Continuous acetone-butanol-ethanol production by corn stalk immobilized cells. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2009. 36, 1117-1121.
89. Dey G., Singh B, Banerjee R. Immobilization of α -amilase produced by *Bacillus circulans* GRS 313. En: *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2003. 46(2): 167-176.
90. Abu Al-Rub F.A, El-Naas M.H, Benyahia F, Ashour I. Biosorption of nickel on blank alginate beads, free and immobilized algal cells. En: *Process Biochemistry*. 2004. 39: 1767-1773.
91. Roig M.G, Pedraz MA y Sánchez JM. Adsorción y biodegradación primaria de surfactantes aniónicos. En: *Ingeniería Química*. Año XXXI (360). 1999.
92. Chung T-P., Tseng H-Y. y Juang R-S. Mass transfer effect and intermediate detection for phenol degradation in immobilized *Pseudomonas putida* systems. *Process Biochemistry*. 2003. 38, 1497-1507.
93. Dursun A.Y. y Tepea O. Internal mass transfer effect on biodegradation of phenol by Ca-alginate immobilized *Ralstonia eutropha*. *Journal of Hazardous Materials*. 2005. 126, 105-111.
94. Shim H., Shin E., Yang S. A continuous fibrous-bed bioreactor for BTEX biodegradation by a co-culture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*. En: *Advances in Environmental Research*. 2001. 7:pp203-216.
95. Suh Y, Park J, Yang J. Biodegradation of cyanide compounds by *Pseudomonas fluorescens* immobilized on zeolite. En: *Enzyme and microbial technology*. 1994. 16 (6): 529-533.
96. Godding B., Smith J. *Staffordshire Biotechnology: Secondary Science Curriculum Review*. Staffordshire County Council Education Department. 1985.
97. Acha de la Cruz O. Extracción del ácido algínico de la especie *Gratelupita doryphora* (Algas pardas-Ancón-Perú). *Técnica*. Universidad Nacional Mayor de Ingeniería – Perú. 1999. 9:19-24.

98. Rittmann, B. E., McCarty, P. L., Biotecnología del Medio ambiente, principios y aplicaciones, 1ra edición, 2001.
99. Di Felice, R. Hydrodynamics of liquid fluidisation, Chemical Engineering Science. 1995. p50
100. Absolom, D. R. Measurement of surface properties of phagocytes, bacteria, and other particles, *Methods Enzymol.* 1986. 16-95.
101. Merimaa E., Heinaru E., Liivak M. Grouping of phenol hydroxylase and catechol 2,3-dioxygenase genes among phenol- and p-cresol-degrading *Pseudomonas* species and biotypes. *Arch Microbiol*, Estonia. 2006.



ANEXOS**ANEXO 1.** Límites máximos permisibles para descargas de efluentes líquidos de actividades minero metalúrgicas

Parámetro	Unidad	Límite en cualquier momento	Límite para el Promedio anual.
pH		6 – 9	6 – 9
Sólidos Totales en Suspensión	mg/L	50	25
Aceites y Grasas	mg/L	20	16
Cianuro Total	mg/L	1	0.8
Arsénico Total	mg/L	0.1	0.08
Cadmio Total	mg/L	0.05	0.04
Cromo Hexavalente (*)	mg/L	0.1	0.08
Cobre Total	mg/L	0.5	0.4
Hierro (Disuelto)	mg/L	2	1.6
Plomo Total	mg/L	0.2	0.16
Mercurio Total	mg/L	0.002	0.0016
Zinc Total	mg/L	1.5	1.2

Fuente: D.S. 0.10-2010-MINAM

ANEXO 2. Composición de los medios de cultivo usados para el crecimiento e identificación de bacterias.

Agar Nutritivo

- Pluripeptona 5.0g
- Extracto de carne 3.0g
- Cloruro de sodio 5.0g
- Agar 15.0g
- Agua destilada 1000ml.

Agar Cetrimide

- Digerido pancreático de gelatina 20.0g
- Cloruro de magnesio 4g
- Sulfato de potasio 10g
- Agar 13.6g
- Bromuro de N-cetil N,N,N- Trimetil amonio 0.3g
- Glicerina 10,0ml
- Agua destilada 1000 ml

King B

- Tripteína 10.0g
- Peptona de Carne 10.0g
- Fosfato dipotásico 1.5g
- Sulfato de Magnesio 1.5g
- Agua destilada 1000ml

Agar Citrato de Simmons

- Citrato de sodio 2,0 g.L⁻¹
- Cloruro de sodio 5,0 g.L⁻¹
- Fosfato dipotásico 1,0 g.L⁻¹
- Fosfato mono potásico 1,0 g.L⁻¹
- Sulfato de magnesio 0,2 g.L⁻¹
- Azul de bromotimol 0,08 g.L⁻¹

- Agar 15,0 g.L⁻¹

Agar Urea

- Tripteína 1,0 g.L⁻¹
- Glucosa 1,0 g.L⁻¹
- Cloruro de sodio 5,0 g.L⁻¹
- Fosfato mono potásico 2,0 g.L⁻¹
- Rojo fenol 0,012 g.L⁻¹
- Agar 15,0 g.L⁻¹

Agar TSI

- Extracto de carne 3,0 g.L⁻¹
- Pluripeptona 20,0 g.L⁻¹
- Cloruro de sodio 5,0 g.L⁻¹
- Lactosa 10,0 g.L⁻¹
- Sacarosa 10,0 g.L⁻¹
- Glucosa 1,0 g.L⁻¹
- Sulfato hierro y amonio 0,2 g.L⁻¹
- Tiosulfato de sodio 0,2 g.L⁻¹
- Rojo fenol 0,025 g.L⁻¹
- Agar 13,0 g.L⁻¹

Agar LIA

- Peptona de gelatina 5,0 g.L-1
- Extracto de levadura 30,0 g.L-1
- Glucosa 1,0 gL-1
- Lisina 10,0 g.L-1
- Citrato de hierro y amonio 0,5 g.L-1
- Tiosulfato de amonio 0,04 g.L-1
- Purpura de bromocresol 0,02 g.L-1
- Agar 15,0 g.L-1

Medio SIM

- Extracto de carne 3,0 g.L-1
- Peptona 30,0 g.L-1
- Hierro peptonizado 0,2 g.L-1
- Tiosulfato de sodio 0,025 g.L-1
- Agar 3,0 g.L-1



ANEXO 3. Resultados del Instituto de Biotecnología del ADN Uchumayo para la extracción del gen rRNA 16S y su secuenciación.



**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
DEL ADN UCHUMAYO E.I.R.L.**

IDENTIFICACION MOLECULAR DE BACTERIAS (30-01-2017)

Solicitante: Edison Obando Zárate/Armando Quispe Sánchez

Muestra: cultivos puros de bacterias

Metodología:

Para la identificación molecular, se usó la secuencia del gen rna16s cuya metodología fue la siguiente. Con una asa se tomó una asada de colonias de la placa petri, la cual fue resuspendido en 200 ul de buffer de lisis, para romper las paredes celulares fueron añadidos perlas de vidrio, se coloco al vortex por 5 minutos y luego a baño maría por 15 minutos a 65 °c, después se agrego 150 ul de mpc, y centrifugo por 5 minutos a máxima velocidad. Se recupero el sobrenadante y se añade 500 ul de isopropanol, despues de la centrifugación, se elimina el sbrenadante y el pellet que contiene el adn fue resuspendido con 50 ul de agua destilada estéril.

Para la amplificación del gen rna16s se añadió 2 µl de adn de cada muestra, 2 µl de la solución de primers (100 nm), y 45 µl de platinum pcr supermix high fidelity. Los tubos, se colocaron en un termociclador bio rad (mycycler™ thermal cycler system with gradient option) a 95 c por 5 minutos, 25 ciclos de 94 c por 60 segundos, 55 c por 60 segundos y 72 c por 60 segundos.

El producto de de la pcr fue purificado utilizando el kit qiaquick pcr purification kit. Donde se utilizo columnas de qiagen y se siguió las instrucciones de la compania. El fragmento purificado fue secuenciado y los resultados son los siguientes:

La cepa pihg: presenta 100 % de identidad con las siguientes cepas registradas en genbank

pseudomonas mendocina

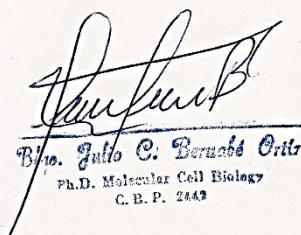
pseudomonas chengduensis

pseudomonas alcaligenes

pseudomonas pseudoalcaligenes

pseudomonas alcaliphila

Conclusion: la cepa pihg es una pseudomona sp y su analogo mas cercano es p. Alcaliphila


B/ro. Julio C. Barahó Ortiz
Ph.D. Molecular Cell Biology
C. B. P. 2442



1

Prolongación San Martín Q-3 Uchumayo - Arequipa - Perú
Sucursal: La Merced N° 125 Int. 125 Cercado - Arequipa
Teléfono: +51-54-493007 www.adnuchumayo.com



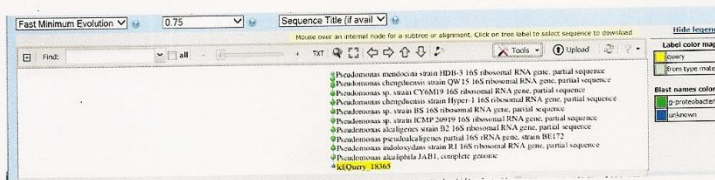
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA DEL ADN UCHUMAYO E.I.R.L.

SECUENCIAS OBTENIDAS Y ANALISIS FILOGENETICO

```
>BacteriaPiHG_1492R TRIM QUALITY: 20
CCGTCCCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGAGCAACCCACTCCCAT
GGTGTGACGGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCGGTGACAT
TCTGATTACCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGA
CTGGCATCCGGACTACGATCGGTTTTATGGGATTAGTCCACCTCGCGGC
TTGGCAACCCTTTGTACCAGCATTGTAGCAGTGTGTAGCCCTGGCCGT
AAGGGCCATGATGACTTGACGTATCCCCACCTTCCTCCGTTTGTCAAC
GGCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATACGTGCTGGTAACTAAGGACAAG
GGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCAACATCTCACGACAGAGCTGAC
GACAGCCATGCAGCACCTGTGTCTGAGTTCGGGAAAGCACAATCCATCT
CTGGAAAGTTCTCAGCATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTT
CGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCAAT
TGAGTTTTAACCTTGGCGCGTACTCCCCAGGGGTCAACTTAATGCGTT
AGCTGCGCCACTAAGTTCTCAAGGAACCAACGGCTAGTTGACATCGTTT
AGCGGTGGACTACCAGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTCG
CACCTCAGTGTAGTATCAGTCCaggtGGTFCGCTTCGCCACTGGGTGTC
CTTCTATATCTACGCATTTACCCGTACACAaggaattCCACCACCTC
TACCGTACTTAGCTCG
```

```
>BacteriaPiHG_27F TRIM QUALITY: 20
CAGTCGAGCGGATGaaGGGAGCTTGCCTCCCTGATTTAGCGCGGACGGGT
GAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGGGATAACGTCCGAAAGG
AACGCTAATACCGCATACGTCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGC
CTTGGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTGCGATTAGCTAGTTGGTGAGTAAT
GGCTCACAAGCGCAGGATCCGTAACGGTCTGAGAGGATGATCAGTCAC
ACTGGAAC TGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGCAGCAGTGGGAA
TATTGGACAATGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGA
AGGTCTTCGGATTGTAAGCACTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAACTT
AATACGTTAGTGTTTGACGTTACCACAGAATAAGCACCGGCTAACTTC
GTGGCAGCAGCCCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAC
TGGCGCTAAAGCGCGGTAGGTGGTTCGTTAAGTTGGATGTGAAGCCCC
GGGCTCAACTGGGAAGTGCATCCAAAATGGCGAGCTAGAGTACGGTAG
AGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAG
AACACAGTGGCGAAGGCGACCCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGC
GAAAGCGTggggagcaacaGGAttAGAtaccTgGTAGTCCAGCCGgTa
naCGATGTC
```

Filogenia Molecular



Julio C. Bernabé Ortiz
Dr. Julio C. Bernabé Ortiz
 M.D. Molecular Cell Biology
 C. B. P. 2449



Prolongación San Martín Q-3 Uchumayo - Arequipa - Perú
 Sucursal: La Merced N° 125 Int. 125 Cercado - Arequipa
 Teléfono: +51-54-493007 www.adnuchumayo.com

ANEXO 4. Bacterias extraídas del BLAST y que fueron analizadas para construir el árbol filogenético de la muestra.

N°	Código GB	NOMBRE BACTERIA
1	JX867714.1	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> strain NCIMB 9867 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
2	JX177733.1	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> strain C70b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
3	DQ178222.1	<i>Pseudomonas mendocina</i> strain PC6 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
4	KR088444.1	<i>Pseudomonas mendocina</i> strain Ze07 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
5	KT695866.1	<i>Pseudomonas</i> sp. ID18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
6	KT695865.1	<i>Pseudomonas</i> sp. ID17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
7	KC514123.1	<i>Pseudonocardia kongjuensis</i> strain OAct415 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
8	JN801160.1	<i>Pseudomonas</i> sp. SD2(2011) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
9	DQ178226.1	<i>Pseudomonas mendocina</i> strain PC19 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
10	KR088447.1	<i>Pseudomonas mendocina</i> strain Ze10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
11	KR088452.1	<i>Pseudomonas mendocina</i> strain Ze15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
12	KT983814.1	<i>Pseudomonas</i> sp. ChenL 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
13	HE575912.1	<i>Pseudomonas</i> sp. 14.2 KSS partial 16S rRNA gene, strain 14.2 KSS
14	EU821343.1	<i>Pseudomonas mendocina</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
15	KF364948.1	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> strain CLRI5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
16	NR_114072.1	<i>Pseudomonas alcaliphila</i> strain NBRC 102411 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
17	NR_115874.1	<i>Pseudomonas oleovorans</i> subsp. <i>lubricantis</i> strain RS1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
18	DQ192041.1	<i>Pseudomonas</i> sp. I91-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
19	NR_024734.1	<i>Pseudomonas alcaliphila</i> strain AL15-21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
20	KF791346.1	<i>Pseudomonas</i> sp. E4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
21	KF010865.1	<i>Pseudomonas</i> sp. HB01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
22	KF010921.1	<i>Pseudomonas toyotomiensis</i> strain CSY-P3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
23	KT351785.1	<i>Pseudomonas</i> sp. ALMHY2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
24	AB905497.1	<i>Pseudomonas</i> sp. ZYSR53 gene for 16S rRNA, partial sequence
25	GU129929.1	<i>Pseudomonas</i> sp. CO-44 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
26	KT834848.1	<i>Pseudomonas mendocina</i> strain L6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
27	KT778823.1	<i>Pseudomonas</i> sp. ZXY-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
28	KP462872.1	<i>Pseudomonas</i> sp. F3-44 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
29	KP462871.1	<i>Pseudomonas indoloxydans</i> strain F3-43 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

30	JX987715.1	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> strain X14-1-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
31	KF573430.1	<i>Pseudomonas</i> sp. F15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
32	KF027444.1	Bacterium TN-05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
33	KF358253.1	<i>Pseudomonas alcaliphila</i> strain L8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
34	KC710974.1	<i>Pseudomonas toyotomiensis</i> strain GL19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
35	AB681755.1	<i>Pseudomonas</i> sp. NBRC 102364 gene for 16S rRNA, partial sequence
36	HM486419.1	<i>Pseudomonas</i> sp. SFA11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
37	JQ396179.1	<i>Pseudomonas</i> sp. HM06 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
38	KP979538.1	<i>Pseudomonas</i> sp. HJX7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
39	KF478203.1	<i>Pseudomonas alcaliphila</i> strain CLSI9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
40	JF905444.1	<i>Pseudomonas alcaliphila</i> strain PNS-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
41	KU319418.1	<i>Pseudomonas</i> sp. S2-15(2016) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
42	KT380617.1	<i>Pseudomonas</i> sp. S31(2015) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
43	KT380532.1	<i>Pseudomonas</i> sp. B28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
44	AB733400.1	<i>Pseudomonas</i> sp. HSI-5 gene for 16S rRNA, partial sequence
45	JQ995482.1	<i>Pseudomonas</i> sp. ICS9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
46	AF181570.1	<i>Pseudomonas</i> cf. <i>pseudoalcaligenes</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
47	KX609725.1	<i>Pseudomonas</i> sp. strain BAB-6007 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
48	KP682487.1	<i>Pseudomonas</i> sp. N68-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
49	KP462876.1	<i>Pseudomonas indoloxydans</i> strain F3-54 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
50	LC015559.1	<i>Pseudomonas chengduensis</i> gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: AF100
51	KM248330.1	<i>Pseudomonas alcaliphila</i> strain Akg2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
52	KF908035.2	<i>Pseudomonas trautweinii</i> strain T 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
53	KJ185384.1	<i>Pseudomonas alcaliphila</i> strain BK-AG13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
54	KC748138.1	<i>Pseudomonas</i> sp. qdzd8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
55	NR_125523.1	<i>Pseudomonas chengduensis</i> strain MBR 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
56	KC342252.1	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> strain ASU-016 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
57	KC140599.1	<i>Pseudomonas</i> sp. WS-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
58	HE575926.1	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> partial 16S rRNA gene, strain 19.4 KSS
59	NR_113617.1	<i>Pseudomonas oleovorans</i> strain NBRC 13583 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
60	J01859.1	ECORRD <i>E.coli</i> 16S ribosomal RNA
61	NR_024570.1	<i>Escherichia coli</i> strain U 5/41 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
62		muestra

ANEXO 5: Datos del conteo celular en cámara de Neubauer, para el crecimiento de *Pseudomonas* en medio King B.

POBLACION BACTERIANA (N° cel/ml)			
Tiempo, hrs	matraz 1	matraz 2	promedio
3	1.60E+06	1.73E+06	1.67E+06
6	1.95E+06	1.85E+06	1.90E+06
9	2.56E+06	2.30E+06	2.43E+06
12	2.79E+06	2.65E+06	2.72E+06
15	3.18E+06	3.26E+06	3.22E+06
18	3.99E+06	3.78E+06	3.89E+06
21	6.25E+06	5.99E+06	6.12E+06
24	1.09E+07	9.84E+06	1.04E+07
27	1.60E+07	1.51E+07	1.55E+07
30	2.28E+07	2.04E+07	2.16E+07
33	2.67E+07	2.59E+07	2.63E+07
36	3.19E+07	3.05E+07	3.12E+07
39	3.63E+07	3.34E+07	3.49E+07
42	3.86E+07	3.79E+07	3.82E+07
45	3.87E+07	4.04E+07	3.95E+07
48	3.97E+07	4.10E+07	4.04E+07
51	4.05E+07	4.19E+07	4.12E+07
54	4.07E+07	4.16E+07	4.12E+07
57	4.04E+07	4.12E+07	4.08E+07
60	4.02E+07	4.15E+07	4.09E+07
63	4.06E+07	4.10E+07	4.08E+07
66	4.02E+07	4.02E+07	4.02E+07
69	4.10E+07	3.94E+07	4.02E+07
72	3.93E+07	3.78E+07	3.86E+07

ANEXO 6: Datos del modelamiento matemático en regresión no lineal, para para el crecimiento de *Pseudomonas* en medio King B.

POBLACION BACTERIANA (N° cel/ml)			
Tiempo	Experimento	Teoría	Residuos
3	1.67E+06	2.69E+05	1.96E+12
6	1.90E+06	4.71E+05	2.03E+12
9	2.43E+06	8.24E+05	2.59E+12
12	2.72E+06	1.43E+06	1.67E+12
15	3.22E+06	2.46E+06	5.86E+11
18	3.89E+06	4.14E+06	6.31E+10
21	6.12E+06	6.78E+06	4.28E+11
24	1.04E+07	1.06E+07	4.78E+10
27	1.55E+07	1.56E+07	3.79E+09
30	2.16E+07	2.13E+07	9.53E+10
33	2.63E+07	2.69E+07	3.12E+11
36	3.12E+07	3.16E+07	1.09E+11
39	3.49E+07	3.50E+07	2.40E+10
42	3.82E+07	3.73E+07	8.43E+11
45	3.95E+07	3.88E+07	5.29E+11
48	4.04E+07	3.97E+07	4.86E+11
51	4.12E+07	4.02E+07	1.05E+12
54	4.12E+07	4.05E+07	4.83E+11
57	4.08E+07	4.06E+07	2.43E+10
60	4.09E+07	4.07E+07	1.22E+10
63	4.08E+07	4.08E+07	1.88E+08
66	4.02E+07	4.08E+07	3.53E+11
69	4.02E+07	4.08E+07	4.01E+11
72	3.86E+07	4.09E+07	5.26E+12
SUMATORIA			1.94E+13
a=	23.25		
b=	29.55		
z=	4.09E+07		

ANEXO 7: Datos del conteo celular en cámara de Neubauer, para el crecimiento de *Pseudomonas* en medio King B con distintas concentraciones de mercurio (ppm).

Tiempo, hrs	POBLACION BACTERIANA (N° cel/ml)						
	blanco	1ppm	3ppm	5ppm	7ppm	10ppm	15ppm
3	1.02E+07	1.07E+07	7.80E+06	8.22E+06	7.22E+06	6.65E+06	2.25E+06
6	1.02E+07	1.15E+07	9.52E+06	1.03E+07	9.40E+06	7.47E+06	2.42E+06
9	1.20E+07	1.45E+07	1.25E+07	1.29E+07	1.16E+07	8.87E+06	2.97E+06
12	1.54E+07	1.84E+07	1.59E+07	1.44E+07	1.25E+07	1.05E+07	3.15E+06
15	1.76E+07	2.02E+07	1.81E+07	1.63E+07	1.38E+07	1.17E+07	3.46E+06
18	2.50E+07	3.15E+07	2.24E+07	1.94E+07	1.62E+07	1.26E+07	4.01E+06
21	3.96E+07	4.38E+07	2.95E+07	2.59E+07	1.82E+07	1.44E+07	4.56E+06
24	5.44E+07	5.60E+07	4.28E+07	3.31E+07	2.01E+07	1.62E+07	6.10E+06
27	7.32E+07	7.46E+07	5.59E+07	4.25E+07	2.35E+07	1.92E+07	7.10E+06
30	9.67E+07	8.89E+07	6.67E+07	5.25E+07	2.92E+07	2.20E+07	9.46E+06
33	1.06E+08	1.04E+08	7.90E+07	5.97E+07	3.89E+07	2.91E+07	1.15E+07
36	1.14E+08	1.15E+08	8.65E+07	6.61E+07	4.69E+07	3.58E+07	1.60E+07
39	1.20E+08	1.23E+08	9.13E+07	7.00E+07	5.50E+07	4.25E+07	1.98E+07
42	1.24E+08	1.24E+08	9.38E+07	7.32E+07	5.90E+07	4.85E+07	2.47E+07
45	1.27E+08	1.29E+08	9.54E+07	7.46E+07	6.19E+07	5.41E+07	3.05E+07
48	1.28E+08	1.28E+08	9.80E+07	7.70E+07	6.27E+07	5.68E+07	3.51E+07
51	1.28E+08	1.31E+08	9.87E+07	7.91E+07	6.45E+07	5.73E+07	3.82E+07
54	1.30E+08	1.33E+08	9.98E+07	8.05E+07	6.66E+07	5.72E+07	4.15E+07
57	1.30E+08	1.33E+08	1.02E+08	8.13E+07	6.72E+07	5.78E+07	4.28E+07
60	1.30E+08	1.34E+08	1.00E+08	8.19E+07	6.78E+07	5.80E+07	4.40E+07
63	1.31E+08	1.34E+08	1.01E+08	8.16E+07	6.77E+07	5.80E+07	4.47E+07
66	1.30E+08	1.33E+08	9.89E+07	8.14E+07	6.77E+07	5.70E+07	4.48E+07
69	1.30E+08	1.32E+08	9.76E+07	8.06E+07	6.64E+07	5.60E+07	4.51E+07
72	1.28E+08	1.31E+08	9.66E+07	7.99E+07	6.61E+07	5.57E+07	4.42E+07

ANEXO 8: Datos del monitoreo del valor de pH, para el crecimiento de *Pseudomonas* en medio King B con distintas concentraciones de mercurio (ppm).

Tiempo, hrs	blanco	1ppm	3ppm	5ppm	7ppm	10ppm	15ppm
0	7.79	7.12	7.03	6.71	6.83	6.99	6.85
3	7.78	7.17	7.01	6.70	6.80	6.96	6.85
6	7.75	7.13	6.99	6.70	6.81	6.88	6.85
9	7.81	7.14	7.04	6.72	6.82	6.90	6.86
12	7.79	7.13	7.03	6.71	6.82	6.89	6.88
15	7.82	7.15	7.04	6.70	6.81	6.92	6.85
18	7.80	7.17	7.01	6.73	6.82	6.93	6.87
21	7.77	7.15	7.02	6.72	6.80	6.95	6.84
24	7.78	7.17	6.97	6.72	6.80	6.94	6.86
27	7.79	7.14	6.98	6.71	6.79	6.92	6.85
30	7.77	7.16	6.97	6.70	6.80	6.90	6.84
33	7.76	7.17	7.01	6.72	6.78	6.90	6.83
36	7.75	7.18	7.01	6.73	6.80	6.91	6.82
39	7.76	7.15	7.00	6.72	6.79	6.89	6.83
42	7.76	7.16	7.01	6.71	6.78	6.88	6.84
45	7.78	7.14	6.98	6.71	6.77	6.90	6.81
48	7.75	7.14	6.98	6.71	6.78	6.92	6.82
51	7.75	7.15	6.99	6.70	6.78	6.89	6.82
54	7.78	7.14	6.97	6.69	6.79	6.87	6.82
57	7.76	7.12	6.98	6.70	6.80	6.86	6.81
60	7.73	7.11	6.97	6.68	6.80	6.85	6.83
63	7.73	7.12	6.95	6.68	6.79	6.87	6.84
66	7.71	7.10	6.94	6.69	6.78	6.85	6.82
69	7.71	7.11	6.92	6.68	6.77	6.88	6.80
72	7.72	7.10	6.94	6.67	6.77	6.86	6.79

ANEXO 9: Resultados después del análisis de la prueba F y la prueba T para comparar la reducción de mercurio de la muestra inicial vs las perlas de alginato en solución sintética de 5ppm de Hg.

Prueba F para varianzas de dos muestras

	<i>A</i>	<i>Inicial</i>
Media	3.802666667	4.772666667
Varianza	0.327474333	0.293089333
Observaciones	3	3
Grados de libertad	2	2
F	1.117319179	
P(F<=f) una cola	0.472295349	
Valor crítico para F (una cola)	19	

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales

	<i>Inicial</i>	<i>A</i>
Media	4.772666667	3.802666667
Varianza	0.293089333	0.327474333
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0.310281833	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	2.132746262	
P(T<=t) una cola	0.049949455	
Valor crítico de t (una cola)	2.131846786	
P(T<=t) dos colas	0.099898911	
Valor crítico de t (dos colas)	2.776445105	

ANEXO 10: Resultados después del análisis de la prueba F y la prueba T para comparar la reducción de mercurio de la muestra inicial vs las *Pseudomonas* atrapadas en alginato en solución sintética de 5ppm de Hg.

Prueba F para varianzas de dos muestras

	<i>Inicial</i>	<i>A+P</i>
Media	4.772666667	0.806
Varianza	0.293089333	0.018619
Observaciones	3	3
Grados de libertad	2	2
F	15.7414111	
P(F<=f) una cola	0.059732121	
Valor crítico para F (una cola)	19	

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales

	<i>Inicial</i>	<i>A+P</i>
Media	4.772666667	0.806
Varianza	0.293089333	0.018619
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0.155854167	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	12.30586446	
P(T<=t) una cola	0.000125254	
Valor crítico de t (una cola)	2.131846786	
P(T<=t) dos colas	0.000250508	
Valor crítico de t (dos colas)	2.776445105	

ANEXO 11. Resultados después del análisis de la prueba F y la prueba T para comparar la reducción de mercurio de la muestra inicial vs las perlas de alginato en muestra de relave.

Prueba F para varianzas de dos muestras

	<i>A r</i>	<i>Inicial r</i>
Media	0.334666667	0.403
Varianza	0.000994333	0.000292
Observaciones	3	3
Grados de libertad	2	2
F	3.405251142	
P(F<=f) una cola	0.227001814	
Valor crítico para F (una cola)	19	

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales

	<i>Inicial r</i>	<i>A r</i>
Media	0.403	0.334666667
Varianza	0.000292	0.000994333
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0.000643167	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	3.300019239	
P(T<=t) una cola	0.01496644	
Valor crítico de t (una cola)	2.131846786	
P(T<=t) dos colas	0.02993288	
Valor crítico de t (dos colas)	2.776445105	

ANEXO 12. Resultados después del análisis de la prueba F y la prueba T para comparar la reducción de mercurio de la muestra inicial vs las *Pseudomonas* atrapadas en alginato en muestra de relave.

Prueba F para varianzas de dos muestras

	<i>A+P r</i>	<i>Inicial r</i>
Media	0.231	0.403
Varianza	0.000819	0.000292
Observaciones	3	3
Grados de libertad	2	2
F	2.80479452	
P($F \leq f$) una cola	0.26282628	
Valor crítico para F (una cola)	19	

Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales

	<i>Inicial r</i>	<i>A+P r</i>
Media	0.403	0.231
Varianza	0.000292	0.000819
Observaciones	3	3
Varianza agrupada	0.0005555	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	4	
Estadístico t	8.93782907	
P($T \leq t$) una cola	0.0004333	
Valor crítico de t (una cola)	2.13184679	
P($T \leq t$) dos colas	0.00086661	
Valor crítico de t (dos colas)	2.77644511	

ANEXO 13. Resultados de las mediciones de ICP para mercurio realizadas en laboratorio de control de calidad de la UCSM



UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 382038 ANEXO 1166
 ✉ laboratoriodeensayo@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Aptdo. 1350
 AREQUIPA - PERU





INFORME DE ENSAYO
Nº DE INFORME: ANA19E16.002193G

Nombre del Cliente	: EDISON OBANDO ZARATE/ARMANDO QUISPE SANCHEZ
Dirección del Cliente	: CALLE CUSCO 140 CARMEN ALTO CAYMA
RUC	: NO CORRESPONDE
Condición del Muestreado	: POR EL CLIENTE
Descripción	: MUESTRA SNT1
Tamaño de muestra	: 100 mL
Fecha de Recepción	: 04/08/2016
Fecha de Inicio del Ensayo	: 04/08/2016
Fecha de Emisión de Informe	: 16/08/2016
Página	: 1 de 1

I. ANALISIS FISICO – QUIMICO:

ANÁLISIS	RESULTADO
DETERMINACIÓN DE METALES TOTALES (mg/L)	
Determination of Metals and Trace Elements in Water and Wastes by Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry EPA METHOD 200.7	
Mercurio (Hg)	4,150

OBSERVACIONES:

- Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INACAL –DA.
- Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas y no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad



Q.F. Ricardo A. Abril Ramírez
 CQFDA 00624
 ESPECIALISTA/EN CONTROL DE CALIDAD LECC





UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 382038 ANEXO 1166
✉ laboratoriodensayo@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Apto. 1350
AREQUIPA - PERU



INFORME DE ENSAYO
N° DE INFORME: ANA19E16.002193I

Nombre del Cliente : EDISON OBANDO ZARATE/ARMANDO QUISPE SANCHEZ
Dirección del Cliente : CALLE CUSCO 140 CARMEN ALTO CAYMA
RUC : NO CORRESPONDE
Condición del Muestreado : POR EL CLIENTE
Descripción : MUESTRA SNT1
Tamaño de muestra : 100 mL
Fecha de Recepción : 11/08/2016
Fecha de Inicio del Ensayo : 11/08/2016
Fecha de Emisión de Informe : 16/08/2016
Página : 1 de 1

I. ANALISIS FISICO – QUIMICO:

ANÁLISIS	RESULTADO
DETERMINACIÓN DE METALES TOTALES (mg/L)	
Determination of Metals and Trace Elements in Water and Wastes by Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry EPA METHOD 200.7	
Mercurio (Hg)	3,191

OBSERVACIONES:

- Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INACAL –DA.
- Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas y no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad

O.F. Ricardo A. Abril Ramírez
CQFDA.00624
ESPECIALISTA EN CONTROL DE CALIDAD LECC





UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 382038 ANEXO 1166
✉ laboratoriodeensayo@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Apto. 1350
AREQUIPA - PERU



INFORME DE ENSAYO
Nº DE INFORME: ANA19E16.002193J

Nombre del Cliente : EDISON OBANDO ZARATE/ARMANDO QUISPE SANCHEZ
Dirección del Cliente : CALLE CUSCO 140 CARMEN ALTO CAYMA
RUC : NO CORRESPONDE
Condición del Muestreado : POR EL CLIENTE
Descripción : MUESTRA SNT2
Tamaño de muestra : 100 mL
Fecha de Recepción : 11/08/2016
Fecha de Inicio del Ensayo : 11/08/2016
Fecha de Emisión de Informe : 16/08/2016
Página : 1 de 1

I. ANALISIS FISICO – QUIMICO:

ANÁLISIS	RESULTADO
DETERMINACIÓN DE METALES TOTALES (mg/L)	
Determination of Metals and Trace Elements in Water and Wastes by Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry EPA METHOD 200.7	
Mercurio (Hg)	0,704

OBSERVACIONES:

- Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INACAL –DA.
- Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas y no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad

Q.F. Ricardo A. Abril Ramírez
COFDA 00624
ESPECIALISTA EN CONTROL DE CALIDAD LECC



UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 382038 ANEXO 1166
✉ laboratoriodensayo@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Aptdo. 1350
AREQUIPA - PERU



INFORME DE ENSAYO
N° DE INFORME: ANA19E16.002193H


Nombre del Cliente : EDISON OBANDO ZARATE/ARMANDO QUISPE SANCHEZ
Dirección del Cliente : CALLE CUSCO 140 CARMEN ALTO CAYMA
RUC : NO CORRESPONDE
Condición del Muestreado : POR EL CLIENTE
Descripción : MUESTRA RLV1
Tamaño de muestra : 100 mL
Fecha de Recepción : 04/08/2016
Fecha de Inicio del Ensayo : 04/08/2016
Fecha de Emisión de Informe : 16/08/2016
Página : 1 de 1

I. ANALISIS FISICO – QUIMICO:

ANÁLISIS	RESULTADO
DETERMINACIÓN DE METALES TOTALES (mg/L)	
Determination of Metals and Trace Elements in Water and Wastes by Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry EPA METHOD 200.7	
Mercurio (Hg)	0,421

OBSERVACIONES:

- Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INACAL –DA.
- Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas y no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad


Q.F. Ricardo A. Abril Ramírez
CQFDA 00624
ESPECIALISTA EN CONTROL DE
CALIDAD LECC





UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 382038 ANEXO 1166
✉ laboratoriodeensayo@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Aptdo. 1350
AREQUIPA - PERU



INFORME DE ENSAYO
Nº DE INFORME: ANA19E16.002193K

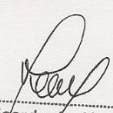
Nombre del Cliente : EDISON OBANDO ZARATE/ARMANDO QUISPE SANCHEZ
Dirección del Cliente : CALLE CUSCO 140 CARMEN ALTO CAYMA
RUC : NO CORRESPONDE
Condición del Muestreado : POR EL CLIENTE
Descripción : MUESTRA RLV 1
Tamaño de muestra : 100 mL
Fecha de Recepción : 11/08/2016
Fecha de Inicio del Ensayo : 11/08/2016
Fecha de Emisión de Informe : 16/08/2016
Página : 1 de 1

I. ANALISIS FISICO – QUIMICO:

ANÁLISIS	RESULTADO
DETERMINACIÓN DE METALES TOTALES (mg/L)	
Determination of Metals and Trace Elements in Water and Wastes by Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry EPA METHOD 200.7	
Mercurio (Hg)	0,358

OBSERVACIONES:

- Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INACAL –DA.
- Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas y no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad


Q.F. Ricardo A. Abriil Ramírez
COFDA 30824
ESPECIALISTA EN CONTROL DE CALIDAD LECC





UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 362038 ANEXO 1166
✉ laboratoriodeensayo@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Aptdo. 1350
AREQUIPA - PERU



INFORME DE ENSAYO
N° DE INFORME: ANA19E16.002193Ñ

Nombre del Cliente	: EDISON OBANDO ZARATE/ARMANDO QUISPE SANCHEZ
Dirección del Cliente	: CALLE CUSCO 140 CARMEN ALTO CAYMA
RUC	: NO CORRESPONDE
Condición del Muestreado	: POR EL CLIENTE
Descripción	: MUESTRAS VARIAS
Tamaño de muestra	: 100 mL
Fecha de Recepción	: 02/09/2016
Fecha de Inicio del Ensayo	: 02/09/2016
Fecha de Emisión de Informe	: 10/09/2016
Página	: 1 de 1

I. ANALISIS FISICO – QUIMICO:

ANÁLISIS	RESULTADO
DETERMINACIÓN DE METALES TOTALES (mg/L) Determination of Metals and Trace Elements in Water and Wastes by Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry EPA METHOD 200.7 Mercurio (Hg)	
MUESTRA RLVO 2	0,333
MUESTRA RLVO 3	0,201
SNT0 2	4,325
SNT0 3	0,961

OBSERVACIONES:

- Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INACAL –DA.
- Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas y no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad

Q.F. Ricardo A. Abril Ramírez
CQFDA 00624
ESPECIALISTA EN CONTROL DE
CALIDAD LECC





UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 382038 ANEXO 1166
✉ laboratorioensayo@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Aptdo. 1350
AREQUIPA - PERU



INFORME DE ENSAYO
N° DE INFORME: ANA19116.0021930

Nombre del Cliente : EDISON OBANDO ZARATE/ARMANDO QUISPE SANCHEZ
Dirección del Cliente : CALLE CUSCO 140 CARMEN ALTO CAYMA
RUC : NO CORRESPONDE
Condición del Muestreado : POR EL CLIENTE
Descripción : MUESTRAS VARIAS
Tamaño de muestra : 100 mL
Fecha de Recepción : 19/09/2016
Fecha de Inicio del Ensayo : 19/09/2016
Fecha de Emisión de Informe : 22/09/2016
Página : 1 de 1

I. ANALISIS FISICO – QUIMICO:

ANÁLISIS	RESULTADO
DETERMINACIÓN DE METALES TOTALES (mg/L) Determination of Metals and Trace Elements in Water and Wastes by Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry EPA METHOD 200.7 Mercurio (Hg)	
MUESTRA SNT 1-1	5,132
MUESTRA SNT 1-2	3,892
MUESTRA SNT 1-3	0,753

OBSERVACIONES:

- Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INACAL –DA.
- Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas y no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad

Q.F. Ricardo A. Abril Ramírez
CQFDA 00824
ESPECIALISTA EN CONTROL DE
CALIDAD I.ECC





UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ + 51 54 382038 ANEXO 1166
✉ laboratoriodensayo@ucsm.edu.pe 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Apto. 1350
AREQUIPA - PERU



INFORME DE ENSAYO
N° DE INFORME: ANA03J16.002193P

Nombre del Cliente	: EDISON OBANDO ZARATE/ARMANDO QUISPE SANCHEZ
Dirección del Cliente	: CALLE CUSCO 140 CARMEN ALTO CAYMA
RUC	: NO CORRESPONDE
Condición del Muestreado	: POR EL CLIENTE
Descripción	: MUESTRAS VARIAS
Tamaño de muestra	: 100 mL
Fecha de Recepción	: 03/10/2016
Fecha de Inicio del Ensayo	: 03/10/2016
Fecha de Emisión de Informe	: 06/10/2016
Página	: 1 de 1

I. ANALISIS FISICO – QUIMICO:

ANALISIS	RESULTADO
DETERMINACIÓN DE METALES TOTALES (mg/L) Determination of Metals and Trace Elements in Water and Wastes by Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry EPA METHOD 200.7 Mercurio (Hg)	
MUESTRA RLV 1-1	0,387
MUESTRA RLV 1-2	0,304
MUESTRA RLV 1-3	0,234

OBSERVACIONES:

- Este documento al ser emitido sin el símbolo de acreditación, no se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INACAL –DA.
- Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas y no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad

Q.F. Ricardo A. Abril Ramirez
CQFDA 00624
ESPECIALISTA EN CONTROL DE
CALIDAD LECC

