

**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA  
SEDE QUITO**

**CARRERA:  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS  
NATURALES**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:  
INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES**

**TEMA:  
BIORREMEDIACIÓN DE AGUA CONTAMINADA CON ARSÉNICO  
PROVENIENTE DE LA PARROQUIA TOACASO, MEDIANTE EL USO DE  
*Pleurotus ostreatus, Trichoderma harzianum y Pseudomonas aeruginosa***

**AUTORAS:  
CINTHYA VANESSA IMBAGO PULAMARÍN  
EVELYN ANDREA OÑA LUGMAÑA**

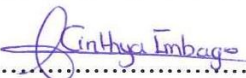
**DIRECTORA:  
LAURA ELIZABETH HUACHI ESPÍN**

**Quito, junio del 2019**

### Cesión de derechos de autor

Nosotras Cinthya Vanessa Imbago Pulamarín y Evelyn Andrea Oña Lugmaña con documento de identificación N°. 1724432750 y N°. 1718825431 respectivamente, manifestamos nuestra voluntad y cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autoras del trabajo de titulación intitulado: “Biorremediación de agua contaminada con arsénico proveniente de la parroquia Toacaso, mediante el uso de *Pleurotus ostreatus*, *Trichoderma harzianum* y *Pseudomonas aeruginosa*”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingenieras en Biotecnología de los Recursos Naturales, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En la aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autoras nos reservamos los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

  
.....

Nombre: Cinthya Vanessa Imbago Pulamarín  
Cédula: 1724432750  
Junio, 2019

  
.....

Nombre: Evelyn Andrea Oña Lugmaña  
Cédula: 1718825431  
Junio, 2019

### **Declaratoria de coautoría del docente tutor**

Yo declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de titulación, “BIORREMEDIACIÓN DE AGUA CONTAMINADA CON ARSÉNICO PROVENIENTE DE LA PARROQUIA TOACASO, MEDIANTE EL USO DE *Pleurotus ostreatus*, *Trichoderma harzianum* y *Pseudomonas aeruginosa*” realizado por Cinthya Vanessa Imbago Pulamarin y Evelyn Andrea Oña Lugmaña, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana, para ser considerado como trabajo final de titulación.



Laura Elizabeth Huachi Espín

C.I: 1711113744

Quito, junio 2019

## Dedicatoria

*A la Fundación Hanss Seidel y Fundación Sojae por el apoyo incondicional en todo este tiempo.*

*A la familia que la vida me obsequio en forma de amigos quienes supieron darme fuerza en todo este proceso.*

*A Hening, Philip, Yuko, Azu, Dar, Gaby, Pao, Kaya, Xio, Su, Shyri, Joseph, Andre, Alejo, Ni y Anita quienes representan parte importante de mi vida.*

*Cin...*

*A Dios por permitirme llegar a esta etapa tan especial en mi formación profesional, por todos los momentos que me han enseñado a valorarlo cada día más.*

*A mi madre María J. por ser el pilar fundamental en mi vida quien con su amor, esfuerzo y ejemplo me enseñó a no rendirme y siempre perseverar ante cualquier circunstancia demostrando su apoyo incondicional en este proceso.*

*A mi hermano Fabricio, quien estuvo dispuesto a escucharme y ayudarme en cualquier momento con su apoyo y fortaleza me incentivó a una mejora constante.*

*A Gaby, Mawry y Diego quienes de una u otra manera me apoyaron y demostraron que el mejor regalo es la amistad y lo he recibido de ustedes.*

*Eve...*

## **Agradecimientos**

A la Universidad Politécnica Salesiana por inculcarnos el espíritu Salesiano de buenos cristianos y honrados ciudadanos, forjando profesionales responsables y comprometidos.

A nuestra tutora y amiga MSc. Laura Huachi, por ser la guía en esta etapa de nuestras vidas, por impartir sus conocimientos, tiempo, paciencia y amistad incondicional.

Al grupo de Investigación NUNKUI WAKAN por el financiamiento del proyecto.

A los laboratorios del Centro de Investigación y Valoración de Biodiversidad especialmente al Ing. Johana Meneses quien nos brindó su apoyo.

## Índice

<b>Resumen</b> .....	12
<b>Abstract</b> .....	13
<b>Introducción</b> .....	1
<b>Capítulo I</b> .....	5
<b>Marco teórico</b> .....	5
<b>1.1. Antecedentes de la contaminación de agua por metales pesados</b> .....	5
<b>1.2. Arsénico</b> .....	5
<b>1.2.1. Arsénico en agua</b> .....	7
<b>1.2.2. Toxicocinética del Arsénico</b> .....	8
<b>1.3. Biorremediación de metales pesados</b> .....	9
<b>1.3.1. Técnicas de Biorremediación</b> .....	10
<b>1.3.2. Biorremediación microbiana</b> .....	10
<b>1.4. Microorganismos utilizados en el proceso de Biorremediación</b> .....	12
<b>1.4.1. Importancia de la pared celular fúngica en el proceso de captación de metales pesados</b> .....	12
<b>1.4.2. Mecanismos de interacción de <i>Trichoderma harzianum</i> y <i>Pleurotus ostreatus</i> frente a metales pesados</b> .....	13
<b>1.4.4. <i>Trichoderma harzianum</i></b> .....	17
<b>1.4.5. <i>Pleurotus ostreatus</i></b> .....	19
<b>1.4.6. <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b> .....	21

<b>Capítulo II</b> .....	24
<b>Marco metodológico</b> .....	24
<b>2.1. Fase de Campo</b> .....	24
<b>2.1.1. Georreferenciación</b> .....	24
<b>2.1.2. Muestreo de aguas</b> .....	24
<b>2.1.3. Muestreo de suelos</b> .....	24
<b>2.2.1. Preparación medios de cultivo</b> .....	25
<b>2.2.2. Diluciones seriadas</b> .....	25
<b>2.2.3. Siembra de microorganismos</b> .....	25
<b>2.2.4. Purificación de microorganismos</b> .....	26
<b>2.2.5. Conservación microorganismos</b> .....	28
<b>2.2.6. Conteo por cámara de Neubauer</b> .....	28
<b>2.2.7. Preparación de inóculos</b> .....	30
<b>2.3. Montaje del experimento</b> .....	31
<b>2.3.1. Diseño experimental</b> .....	31
<b>2.3.2. Preparación de los contenedores</b> .....	31
<b>2.3.3. Preparación de las unidades experimentales</b> .....	32
<b>2.3.4. Aplicación de los inóculos</b> .....	32
<b>2.3.5. Tratamientos del ensayo</b> .....	32
<b>2.3.6. Variables del ensayo</b> .....	33

2.4.	Análisis Físicoquímicos .....	33
2.4.1.	Análisis de la concentración de As .....	33
2.5.	Análisis estadístico .....	34
Capítulo III	.....	35
Resultados y discusión	.....	35
3.1.	Identificación de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	35
3.1.1.	Identificación macroscópica.....	35
3.1.2.	Identificación microscópica .....	36
3.2.	Identificación de <i>Trichoderma harzianum</i> .....	37
3.2.1.	Identificación macroscópica.....	37
3.2.2.	Identificación microscópica .....	38
3.3.	Identificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	39
3.3.1.	Identificación macroscópica.....	39
3.3.2.	Identificación microscópica .....	40
3.4.	Análisis estadístico de las variables del ensayo.....	41
3.4.1.	Temperatura.....	41
3.4.2.	Conductividad Eléctrica.....	43
3.4.3.	Potencial de Hidrógeno .....	45
3.4.4.	Análisis de la concentración final de As con Tuckey al 5% y porcentaje de remoción de cada tratamiento .....	48



<b>Conclusiones</b> .....	52
<b>Recomendaciones</b> .....	53
<b>Bibliografía</b> .....	54
<b>Anexos</b> .....	66

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Tratamientos aplicados a las unidades de experimentación.....	32
<b>Tabla 2.</b> Identificación macroscópica de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	35
<b>Tabla 3.</b> Identificación microscópica de <i>Pleurotus ostreatus</i> .....	36
<b>Tabla 4.</b> Identificación macroscópica de <i>Trichoderma harzianum</i> .....	37
<b>Tabla 5.</b> Identificación microscópica de <i>Trichoderma harzianum</i> .....	38
<b>Tabla 6.</b> Identificación macroscópica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	39
<b>Tabla 7.</b> Identificación microscópica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	40
<b>Tabla 8.</b> Análisis de varianza para la variable Temperatura y Tuckey al 5 % .....	41
<b>Tabla 9.</b> Análisis de varianza para la variable Conductividad eléctrica y Tuckey al 5% .....	43
<b>Tabla 10.</b> Análisis de varianza para la variable pH y Tuckey al 5% .....	45
<b>Tabla 11.</b> Análisis de la concentración final de As con Tuckey al 5% y porcentaje de remoción de cada tratamiento .....	48

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Diseño experimental .....	31
<b>Figura 2.</b> Mecanismos de interacción de los hongos frente al Arsénico.....	67
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de metilación de Arsénico.....	66
<b>Figura 4.</b> Arsenito oxidasa .....	68
<b>Figura 5.</b> Resistencia y desintoxicación de As.....	68

## Índice de anexos

<b>Anexo 1.</b> Metabolismos de microorganismos frente a Arsénico .....	66
<b>Anexo 2.</b> Coordenadas UTM de la zona de muestreo en Toacaso .....	69
<b>Anexo 3.</b> Parámetros analizados y sus metodologías .....	70
<b>Anexo 4.</b> Análisis inicial de los parámetros físico-químicos del agua .....	76
<b>Anexo 5.</b> Datos de Variables (Temperatura, potencial de hidrógeno y conductividad eléctrica).....	88
<b>Anexo 6.</b> Gráfica promedio de porcentaje de remoción de As por cada tratamiento	91
<b>Anexo 7.</b> Fase Experimental .....	92

## Resumen

La parroquia de Toacaso ubicada en la provincia de Cotopaxi, presenta una elevada contaminación del agua con arsénico, proveniente de forma natural del Iliniza, llegando a concentraciones de 0.70 ppm, lo que ha causado acumulación del metaloide en los cultivos y enfermedades como el cáncer en sus habitantes. El objetivo de este estudio fue evaluar la eficiencia de *Pleurotus ostreatus*, *Trichoderma harzianum* y *Pseudomonas aeruginosa* en la biorremediación de aguas contaminadas con As. El trabajo se llevó a cabo en dos fases: de campo y de laboratorio. En el diseño experimental, se utilizó un DBCA con 5 tratamientos y 4 repeticiones. T<sub>0</sub> (agua contaminada con arsénico); T<sub>1</sub> (agua contaminada con arsénico + *Pleurotus ostreatus*); T<sub>2</sub> (agua contaminada con arsénico + *Trichoderma harzianum*); T<sub>3</sub> (agua contaminada con arsénico + *Pseudomonas aeruginosa*); T<sub>4</sub> (agua contaminada con arsénico + *Pleurotus ostreatus* + *Trichoderma harzianum* + *Pseudomonas aeruginosa*). Se utilizó ANOVA con Tuckey del 5% para variables con significancia. El tratamiento con *Pleurotus ostreatus* resultó el mejor, con una degradación de 0.70 ppm a 0.22 ppm de As, debido a que el hongo realiza biosorción a través de los micelios de rápida expansión y la quitina, siendo un excelente captador de iones metálicos. Con estos resultados, la comunidad de Toacaso podrá implementar el uso de *Pleurotus ostreatus* en sus ríos para disminuir la bioacumulación del metal en aguas, suelos y cultivos, siendo así la biorremediación una alternativa amigable con el ambiente, de fácil aplicación.

**Palabras clave:** *Pleurotus ostreatus*, biosorción, metilación, biomasa, metaloide

## Abstract

The parish of Toacaso located in the province of Cotopaxi, presents a high levels of water pollution with arsenic (As), originated naturally from Iliniza Volcano, reaching concentrations of 0.70 ppm, which has caused metalloid accumulation in crops and diseases such as cancer in their inhabitants. The aim of this study was to evaluate the efficiency of *Pleurotus ostreatus*, *Trichoderma harzianum* and *Pseudomonas aeruginosa* in the bioremediation of water contaminated with As. The research was carried out in two phases: field study and laboratory work. In the experimental design, a DBCA with 5 treatments and 4 repetitions was used. Being T<sub>0</sub> (water contaminated with arsenic); T1 (water contaminated with arsenic + *Pleurotus ostreatus*); T2 (water contaminated with arsenic + *Trichoderma harzianum*); T3 (water contaminated with arsenic + *Pseudomonas aeruginosa*); T4 (water contaminated with arsenic + *Pleurotus ostreatus* + *Trichoderma harzianum* + *Pseudomonas aeruginosa*) ANOVA with Tuckey of 5% was used for significant variables. The treatment with *Pleurotus ostreatus* was the best, with a degradation of 0.70 ppm to 0.22 ppm of As, due to the process of biosorption that the fungus performs through rapidly growing mycelia and chitin, being an excellent metal ion trap. With these results, the Toacaso community will be able to implement the use of *Pleurotus ostreatus* in its rivers to reduce the bioaccumulation of the metal in water, soil and crops, thus being bioremediation a friendly alternative to the environment, easy to apply.

**Key words:** *Pleurotus ostreatus*, biosorption, methylation, biomass, metalloid

## Introducción

En América Latina se ha observado un considerable incremento de la concentración de arsénico en las fuentes de agua, causado por factores naturales de origen geológico. Es así que se genera un impacto ambiental que limita el uso de dicho recurso natural, impidiendo el desarrollo socioeconómico y sostenible (Bundschuh, Pérez, & Litter, 2009). Además la exposición prolongada de As en agua de consumo en seres humanos ha generado daños crónicos a la salud, convirtiéndose en un problema global (Rangel Montoya, Montañez Hernández, Luévanos Escareño, & Balagurusamy, 2015).

El As se identifica como "metaloides", elemento natural, cristalino con características intermedias entre metales y no metales. Se ubica como vigésimo elemento en la corteza terrestre, el décimo cuarto en el agua de mar y el décimo segundo en el cuerpo humano (R. Singh, Singh, Parihar, Singh, & Prasad, 2015), sus formas inorgánicas son arsenito As (III) y arseniato As (V), las mismas que son consideradas más tóxicas en comparación a las formas orgánicas, adicionalmente se caracteriza por ser ubicuo en el ambiente y altamente venenoso para todas las formas de vida (Srivastava et al., 2011), al causar varias enfermedades como: El eczema de la piel, hiperqueratosis de palmas, verrugas, leucemia, insuficiencia renal aguda, entre otras (A. L. Singh, Singh, & Srivastava, 2013).

La parroquia de Toacaso se encuentra localizada en la provincia de Cotopaxi, el agua que la población consume proviene de los Ilinizas (Pincha Gualberto et al., 2014). En el año 2017 el MAE (Ministerio del Ambiente Ecuador), realizó el análisis físico - químico del agua detectando el incumplimiento del Límite Máximo Permisible de la concentración de As en el agua de uso pecuario en el río Pucahuaico con valores de 0.26 ppm, superando los límites de 0.20 ppm para uso pecuario y 0.10 ppm para riego,

confirmando la concentración elevada de arsénico en el agua utilizada para riego de cultivos de hortalizas y pastos (MAG, 2017).

La comunidad afirma que al beber esta agua los animales mueren, debido a la concentración elevada de As presente en el efluente, además se realiza la transferencia en el sistema agua-suelo-cultivo a través del sistema de riego (Apablaza et al., 2017); promoviendo la acumulación del metaloide en los productos agrícolas de consumo en la comunidad (Navoni, De Pietri, Garcia, & Villaamil Lepori, 2012).

Para mejorar esta problemática se han empleado métodos fisicoquímicos de remediación, lamentablemente no han sido efectivos; la biorremediación surge como una alternativa amigable con el ambiente ante el impacto generado, la misma que se realiza a través de procesos naturales (Arora, Singh, & Singh, 2017), siendo la Micorremediación una alternativa, al integrar a los contaminantes como fuente de carbono y energía (Rodríguez Martínez et al., 2017), ayudando a disminuir las concentraciones tóxicas, y generando un menor daño ecológico (Garzón, Rodríguez Miranda, & Hernández Gómez, 2017).

Freddy Ruben & Andres Dario (2017), mencionan a *Pleurotus ostreatus* y *Trichoderma harzianum* como especies que eliminan metales pesados por su rápida reproducción, estos hongos colonizan diferentes sustratos a través del micelio (Freddy Ruben & Andres Dario, 2017), en presencia de As biodegradan toxinas por medio de su capacidad enzimática (Medaura, M., 2013); por su metabolismo la enzima lacasa rompe estructuras y enlaces de compuestos orgánicos e inorgánicos considerándolo como biodegradador y la extensión de las hifas alcanza contaminantes que no son biodegradables por otros organismos (Coello Paredes, 2011).



Además Argumedo-Delira y colaboradores (2009), mencionan que *Trichoderma harzianum* puede retener As en el micelio y esporas, por su pH de 3 a 5 generando una amplia tolerancia.

Estudios de E. Pellizzari, Marinich, Flores, & Giménez (2015), con *Pseudomonas aeruginosa*, indican que su mecanismo de degradación, se basa en la capacidad de estos microorganismos de formar biofilm sobre rocas empleadas como lecho de inmovilización en metaloides, presentando una buena adaptación, asimilación y transformación de As en su forma de arsenito y arseniato por medio de reacciones redox, mecanismos enzimáticos, metilación, quelación, exclusión e inmovilización (Garzón et al., 2017); presentando la capacidad de formar agentes complejantes y ligantes que aumenta la solubilidad y movilidad de los metales en el medio, reduciendo de esta forma el contaminante (Alguacil & Merino, 1998).

El objetivo general de este proyecto es evaluar la eficiencia de *Pleurotus ostreatus*, *Trichoderma harzianum* y *Pseudomonas aeruginosa* en la biorremediación de aguas contaminadas con As a nivel de laboratorio. Los objetivos específicos fueron: Aislar los microorganismos *Pleurotus ostreatus*, *Trichoderma harzianum* y *Pseudomonas aeruginosa* de la zona de estudio; analizar el contenido de As en muestras de agua de los ríos Pucahuaico, Blanco al inicio-final del proyecto y determinar la capacidad biotransformadora de *Pleurotus ostreatus*, *Trichoderma harzianum* y *Pseudomonas aeruginosa* en los diferentes tratamientos.

Como hipótesis alternativa (Ha) se planteó: *Pleurotus ostreatus*, *Trichoderma harzianum* y *Pseudomonas aeruginosa* reducirán la concentración de As que contamina el agua en la parroquia de Toacaso; la hipótesis nula (Ho): *Pleurotus*

*ostreatus*, *Trichoderma harzianum* y *Pseudomonas aeruginosa* no reducirán la concentración de As que contamina el agua en la parroquia de Toacaso.

La fase de campo se realizó en la parroquia de Toacaso – Cotopaxi; los análisis físicos - químicos de las muestras de agua recolectadas se realizó en el laboratorio de Suelos de la UPS sede Cayambe. En el laboratorio, se aplicó un diseño experimental formado por un DBCA construido con 5 tratamientos y 4 repeticiones. T<sub>0</sub> (agua); T<sub>1</sub> (agua contaminada con arsénico + *Pleurotus ostreatus*); T<sub>2</sub> (agua contaminada con arsénico + *Trichoderma harzianum*); T<sub>3</sub> (agua contaminada con arsénico + *Pseudomonas aeruginosa*); T<sub>4</sub> (agua contaminada con arsénico + *Pleurotus ostreatus* + *Trichoderma harzianum* + *Pseudomonas aeruginosa*).

Por medio de este proyecto se brindará herramientas a la comunidad de Toacaso para mitigar la presencia de As en el agua de riego, recuperando la calidad de la misma al aplicar un proceso amigable con el ambiente que permita adoptar medidas correctivas a corto, mediano o largo plazo, mediante través la funcionalidad de la biorremediación.

## Capítulo I

### Marco teórico

#### 1.1. Antecedentes de la contaminación de agua por metales pesados

El agua se contamina por metales pesados y metaloides como Hg, Pb, Cd, Zn, Ni, Cr y As producidos por vía antrópica o natural, afectando drásticamente la seguridad alimentaria y salud pública (Reyes, Vergara, Torres, Díaz, & González, 2016).

El impacto causado por la exposición prolongada y por la bioacumulación de los metales pesados y metaloides es preocupante porque produce trastornos en los sistemas y aparatos de los seres vivos (Reyes et al., 2016), se han reportado a nivel mundial afecciones graves como el cáncer (R. Singh et al., 2015).

#### 1.2. Arsénico

El As es un elemento ampliamente distribuido en la naturaleza, específicamente en la corteza terrestre (Bundschuh et al., 2009). Las concentraciones presentes en la atmósfera de sitios alejados de las actividades humanas varían de 1 a 3 ng/m<sup>3</sup>, en las áreas industriales que emiten As presentan valores de 100 a 300 ng/m<sup>3</sup>, en el agua se ha determinado concentraciones de As menores a 10 µg / L (Albores, A. Quintanilla, B. Del Razo, M. Cebrián, 2015).

Además, comparte propiedades del grupo V, con el N y P. Cuando se encuentra en estado oxidado presenta valencias <sup>+3</sup> y <sup>+5</sup>.

Se encuentra distribuido geológicamente, formando parte de alrededor de 250 minerales, los cuales incluyen arseniatos (60 %), sulfuros y sulfosales (20 %), una cantidad menor de arseniuros, óxidos y silicatos (Castelo Granizo, 2015).

Presenta cuatro estados de oxidación: Arsénico ( $\text{As}^0$ ), arsenito ( $\text{As}^{\text{III}}$ ), arseniato ( $\text{As}^{\text{V}}$ ) y arsina ( $\text{As}^{-3}$ ), su solubilidad depende del pH y del entorno iónico; entre ellos el  $\text{As}^{\text{V}}$  es un estado termodinámicamente estable en agua en condiciones aeróbica, mientras que  $\text{As}^{\text{III}}$  predomina en ambientes redox reducidos (R. Singh et al., 2015).

Los compuestos de As (V) son estables en la naturaleza por que poseen electrones compartidos, los compuestos de As (III), originan derivados piramidales con un par de electrones no compartidos, permitiéndole formar complejos con ácidos de Lewis y metales de transición (Albores, A. Quintanilla, B. Del Razo, M. Cebrián, 2015).

Concentraciones elevadas de As, contaminan el ambiente por medio de interacciones naturales, emisiones volcánicas, reacciones ambientales, actividades biológicas y antropogénicas (Rangel Montoya et al., 2015). En aguas naturales se encuentra como especie disuelta, formando oxianiones (Bundschuh et al., 2009).

Ha sido considerado como un elemento, metal y metaloide, ya que posee propiedades intermedias entre metales y no metales (Castelo Granizo, 2015). Presenta un riesgo para la salud humana al ingerirse en alimentos o agua en límites superiores de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  según la OMS (Organización Mundial de la Salud), convirtiéndose en una amenaza global (Singh, Singh, Parihar, Singh, & Prasad, 2015), el As (III), se considera más agresivo para la salud humana, debe ser eliminado de los suministros de agua para evitar efectos adversos (Senior, Cornejo-Rodríguez, Tobar, 2016).

El As presente en el agua del Ecuador es de origen volcánico debido a su localización en el cinturón de fuego del Pacífico (Castelo Granizo, 2015).

### 1.2.1. Arsénico en agua

Este metaloide resulta ser problemático cuando se disuelve en agua a través de desplazamiento de iones la desorción a un ( $\text{pH} > 8.5$ ), la reducción de arseniato a arsenito, y disolución reductora de óxidos de Fe y Mn (hidróxido) (R. Singh et al., 2015); el óxido de Fe, almacena arsénico concentrado (Manahan, 2007) mientras que la reducción proporcional de As-Fe-Mn son el medio global dominante por el cual se generan altas concentraciones de As disuelto en agua (R. Singh et al., 2015).

En ambientes acuáticos aerobios, se presentan en dos formas:  $\text{As}^{\text{V}}$ ,  $\text{As}^{\text{III}}$  y El arseniato ( $\text{AsO}_4^{3-}$ ,  $\text{HAsO}_4^{2-}$  y  $\text{H}_2\text{AsO}_4^-$ ), mientras que  $\text{As}^{\text{III}}$  ( $\text{As}(\text{OH})_3$ ,  $\text{As}(\text{OH})_4$ ,  $\text{AsO}_2\text{OH}_2^-$  y  $\text{AsO}_3^{3-}$ , predomina en condiciones deficientes de oxígeno por ejemplo en aguas subterráneas o ambientes subsuperficiales (Shakoor et al., 2016).

Las especies metiladas generalmente se presentan en menor cantidad en soluciones acuosas en comparación con las formas inorgánicas de As y los complejos de arsénico carbonato también existen dentro de las aguas naturales (Shakoor et al., 2016).

Además, se considera al As como impureza de minerales, entre ellos el Cu, Pb, Zn, Co, el acceso de este metaloide a las aguas naturales se realiza mediante la disolución de sus sales solubles y por la de sus complejos orgánicos precedentes de emisiones volcánicas (complejos con molibdatos y tungstatos). Los arsenitos y arseniatos de metales alcalinos (Na y K) son solubles en un rango amplio de pH, mientras que los formados por otros metales son solubles en aguas cuyo pH es ácido. En especial el arseniato de Ag,  $(\text{NH}_4^+)$  y Mg son solubles en agua a cualquier pH (Marín, 2003).

En aguas sometidas a condiciones moderadas de oxidación se encuentra en gran cantidad la especie de  $\text{As}^{\text{III}}$ , mientras que en aguas de ambientes muy oxidantes el anterior se oxida a  $\text{As}^{\text{V}}$  (Marín, 2003).

Las condiciones geoquímicas que resultan en la contaminación del agua con As, se encuentran asociadas con la existencia del Fe, S, materia orgánica en depósitos (aluviales) producidos por el agua. El Fe liberado de las rocas erosionadas por el agua de río forman depósitos que concentran As (Manahan, 2007).

### **1.2.2. Toxicocinética del Arsénico**

Se considera al As, como el contaminante del agua, por ser tóxico produce envenenamiento agudo como resultado de la ingestión de, aproximadamente 100 mg del elemento. El envenenamiento crónico ocurre con la ingestión continua de pequeñas cantidades de As, durante un periodo largo de tiempo (Manahan, 2007). Su forma inorgánica es una sustancia carcinogénica para el ser humano, siendo incluido por la IARC en el grupo I (Marín, 2003).

El As puede ingresar a los organismos por el tracto gastrointestinal, aparato respiratorio y la vía dérmica que presenta un 2 % de absorción, al penetrar en el organismo experimenta el proceso de bio-transformación, su forma metilada es acumulada en la piel y en sistema renal (Marín, 2003).

La ingestión de As provoca irritación en las membranas gástricas, la contracción involuntaria de muchos músculos, desembocando alteraciones cardíacas graves incluso la muerte del individuo además la acumulación del metaloide produce varios procesos patológicos contribuyendo al desarrollo de cáncer (Marín, 2003).

En los seres humanos y especies animales el proceso de absorción de los compuestos arsenicales por medio de tracto gastrointestinal es elevado (95 %) cuando se administran en solución acuosa, la absorción por vía respiratoria depende del tamaño de partículas inhaladas, solubilidad y la forma química presente.

En las vías superiores se ubican las partículas de mayor tamaño las cuales son transportadas por los cilios y se depositan en el tracto gastrointestinal, en el cual se absorben en base a la solubilidad, partículas menores a 7  $\mu\text{m}$  presentan un índice de absorción de 75 – 85 % (Albores, A. Quintanilla, B. Del Razo, M. Cebrián, 2015).

Se ha determinado de manera general la presencia de As (III) en el aire, cuyo origen es antropogénico, la exposición crónica causa varios trastornos en el sistema digestivo, sistema respiratorio, sistema cardiovascular, sistema hematopoyético, sistema endocrino, sistema renal, sistema neurológico, en última instancia conducen al cáncer (R. Singh et al., 2015).

### **1.3. Biorremediación de metales pesados**

Se describe como un método rentable y respetuoso con el ambiente que convierte a los contaminantes tóxicos recalcitrantes en productos menos agresivos, empleando la acción de diversos tratamientos biológicos (Deshmukh, Khardenavis, & Purohit, 2016).

En este proceso se involucran las relaciones de los microorganismos con los metales, se mencionan métodos de interacción como: la adsorción, la precipitación, la oxidación y las reducciones (Siddiquee et al., 2015).

Se conoce seis procesos distintos para las reacciones químicas entre los microorganismos como: acumulación intracelular; metales asociados a la pared celular; movilización extracelular o inmovilización de metales; interacciones de metal sideróforo; polímero de metales extracelulares y volatilización de metales (Siddiquee et al., 2015).

### 1.3.1. Técnicas de Biorremediación

Se distinguen dos grupos:

- *In situ* involucra el suministro de oxígeno y nutrientes mediante la circulación de soluciones acuosas para estimular a los microorganismos que se producen naturalmente y así degrada los contaminantes presenta la siguiente clasificación: Bioventing, Biosparging, Bioestimulación y Bioaumentación (Ali et al., 2017).
- *Ex situ* involucran la excavación o remoción de tierra o agua contaminada de su lugar de origen y posee la siguiente clasificación: Landfarming, Biorreactor, Micorremediación y Cyanoremediación (Ali et al., 2017).

### 1.3.2. Biorremediación microbiana

Emplea la capacidad metabólica de los hongos y bacterias, para transformar un ambiente contaminado en un estado menos contaminado a través de los micelios fúngicos que desempeñan un papel vital en el proceso (Ali et al., 2017).

Se ha determinado que las células de los microorganismos fúngicos son capaces de eliminar y captar a los iones de metales pesados y metaloides, ofreciendo un método alternativo para su eliminación en aguas (Siddiquee et al., 2015). Los hongos basidiomicetos desempeñan un papel importante en el proceso biorremediación por su robusta morfología y su capacidad metabólica diversa (Deshmukh et al., 2016).

Además existe un creciente interés en la capacidad metabólica insuperable de los hongos para degradar contaminantes al emplear una variedad de sistemas de enzimas extracelulares e intracelulares que incluyen peroxidasas y citocromo P<sub>450</sub> respectivamente, para la desintoxicación y la biodegradación (Deshmukh et al., 2016).



Las propiedades intrínsecas (resistencia a los metales, adaptabilidad a sustratos, habilidad de dispersión.) aseguran la supervivencia del hongo sin importar la concentración y toxicidad del metal, al mismo tiempo estos pueden ser aislados de cualquier hábitat contaminado (Gadd, 2007). Facilitan la biotransformación de los metales y metaloides mediante reacciones químicas tales como oxidación, reducción, metilación y desalquilación. Estas reacciones pueden conducir a la volatilización y reducción de la toxicidad del contaminante (Siddiquee et al., 2015).

Además, se usan bacterias autóctonas o provenientes de diferentes ecosistemas, las cuales serán añadidas o inoculadas en el ambiente contaminado que se requiere biorremediar. Mediante la capacidad metabólica se transforma las moléculas orgánicas complejas en moléculas pequeñas y menos tóxicas.

Weitzman (2015), en su investigación de biorremediación de As presente en agua menciona que los hongos son un grupo muy diverso de organismos, en consecuencia, cada especie e incluso diferentes aislados de la misma especie pueden emplear un mecanismo diferente o una combinación de mecanismos para tolerar y responder ante la presencia de As en su entorno. Además, menciona el uso de *Pleurotus ostreatus* y *Trichoderma harzianum*, como una alternativa para el tratamiento del As en agua por su capacidad para tolerar, eliminar, secuestrar, inmovilizar y desintoxicar eficazmente este metaloide. Estos hongos presentan una combinación de mecanismos intracelular y extracelular que se adhiere a las células fúngicas. Tripathi et al. (2013), nombra en su investigación que *Trichoderma harzianum* presenta tolerancia y capacidad de acumulación de As, además de su mecanismo de bio- volatilización del metal en agua.

Mientras Kapahi & Sachdeva (2017), indican el potencial efectivo de biosorción de metales pesado en *Pleurotus*, hecho demostrado en el estudio de Rhodes (2015), al evidenciar la presencia de cationes de metales pesados en la estructura de este hongo

después de un proceso de biorremediación. Esto explica la capacidad de los basidiomicetos en acumular As (Weitzman, 2015).

#### **1.4. Microorganismos utilizados en el proceso de biorremediación**

##### **1.4.1. Importancia de la pared celular fúngica en el proceso de captación de metales pesados**

Es la primera estructura que mantiene contacto con iones metálicos, estos se sitúan sobre la superficie o interior de la pared celular fúngica antes de interactuar con el material citoplásmico. En casos extremos la captación intracelular se da por el aumento de la permeabilidad como resultado de la ruptura de la pared celular fúngica (Kapoor & Viraraghavan, 1995). Se considera como una envoltura externa compleja, formada por un armazón elástico dividido en una parte fibrilar (quitina, celulosa,  $\beta$ -glucano), una matriz (  $\alpha$ -glucano, quitosanos, poliuranidas, glucoproteínas, lípidos, sales inorgánicas y pigmentos) (Dhankhar & Hooda, 2011), y quitina que es un polímero de n-acetilglucosamina con grupos de unión a metales como: amina, imidazol, fosfato, sulfato, sulfhidrilo e hidroxilo que están presentes en sus polímeros (Dhankhar & Hooda, 2011). La cantidad de quitina cambia durante el crecimiento de los micelios, esto puede explicar las variaciones en la capacidad de absorción del metal con la edad celular (Kapoor & Viraraghavan, 1995). Por lo tanto, inmovilizan los metales y metaloides, mediante mecanismos fisiológicos y bioquímicos que favorecen a la quelación, acumulación y la biosorción.

A través de la captación de iones por medio de la biomasa del hongo es capaz de tolerar un elevado potencial tóxico (Argumedo-Delira et al., 2009) realizando el proceso de bioacumulación. Además *Trichoderma harzianum*, tolera y acumula varios metales pesados como el Cu, Zn, Cd y As en condiciones in vitro (Tripathi et al. 2013).

**1.4.2. Mecanismos de interacción de *Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatus* frente a metales pesados**

- a. **Movilización de metales:** este proceso se da mediante la obtención de productos fúngicos como el ácido cítrico, un eficaz quelante de iones metálicos y ácido oxálico que interactúan con los iones metálicos para producir oxalato insoluble, el resultado se ve en la disolución de metales primarios que contienen fosfato. Estos ácidos orgánicos pueden aumentar la solubilidad del metal por medio de la acidificación de la micosfera y la producción de una estructura de complejo metálico (Dhankhar & Hooda, 2011).
- b. **Biosorción:** la interacción del metal con la pared celular de los hongos implica un mecanismo complejo como: el intercambio iónico, la compleción, la cristalización, la adsorción, la precipitación, metilación, quelación. Los grupos funcionales de la pared celular ofrecen una serie de sitios activos capaces de unirse a iones metálicos. Este proceso se ve influenciado por la concentración de biomasa y el comportamiento químico de los metales (Dhankhar & Hooda, 2011). Se clasifica en:
- Absorción en la superficie celular: se produce por interacción fisicoquímica entre el metal y los grupos funcionales presentes en la superficie de la célula fúngica basada en: adsorción física, el intercambio iónico y la absorción química (la complejación, la quelación y la coordinación) (Dhankhar & Hooda, 2011).
  - Acumulación intracelular: tiene lugar en células vivas, asociado al sistema de defensa activo de hongos, reacciona en presencia de metales y metaloides tóxicos. El transporte de metal a través de la membrana celular produce una acumulación.

- **Precipitación / acumulación extracelular:** la captación de metal puede tener lugar tanto en la solución como en la superficie celular, una vez incorporado el metal pesado al citoplasma y acumulado en las vacuolas este es secuestrado por proteínas ricas en grupos sulfhidrilos llamadas metalotioneinas (MT) (Jaramillo & Patiño, 2014).
- c. **Captación de metales y metaloides:** realizado a través de transportadores que se encuentran acoplados metabólicamente en  $H^+$  e impulsado por gradientes de concentración por ejemplo los transportadores de fosfatos que suelen confundir a los metales esenciales e ingresan a metales pesados (Dhankhar & Hooda, 2011).
- d. **Inmovilización intracelular de metales:** implica dos procesos compartimentación y complejación en las vacuolas fúngicas las que desempeñan funciones en la degradación molecular, el almacenamiento de metabolitos, la regulación de las concentraciones citosólicas de iones metálicos y desintoxica los iones metálicos potencialmente tóxicos. mediante proteínas citoplasmáticas llamadas metalotioneínas, un péptido rico en SH. Las metalotioneínas es una proteína de unión a metales que puede modular las concentraciones intracelulares (Dhankhar & Hooda, 2011).
- e. **Biotransformación:** mediante la oxidación, reducción, metilación (ver anexo 1 a) y desalquilación, estas reacciones pueden conducir a la volatilización del metal y reducir la toxicidad del metal (Dhankhar & Hooda, 2011). La combinación de varios mecanismos, cada uno de funcionalidad independiente contribuye a la captación global del metal (ver anexo 1 b).

### 1.4.3. Mecanismos de interacción de *Pseudomonas aeruginosa* frente a metales pesados.

- **Mecanismo de desintoxicación de arsénico (reducción periplásmica)**

Los diferentes sistemas de desintoxicación se basan en los tipos de operones incluido en el citoplasma. Posee genes de la familia arsenato reductasa (ArsC) y un sistema excretor constituido de una bomba ArsB o ArsAB, ATPasa (que consta de dos subunidades: la bomba ArsB y la ArsA) (Simeonova, 2004).

- **Transformación del arsénico: Resistencia y Descodificación.**

Mediante reacciones de oxidación, reducción, *Pseudomonas aeruginosa* metaboliza el arsénico. Estas reacciones se encaminan al sistema de resistencia-destoxificación, la reducción desasimiladora del arseniato y la oxidación del arsenito, se consideran procesos que generan energía. A la vez, se realiza el proceso de inmovilización mediante la formación de biofilms y, al metilar el arsénico se disminuye la toxicidad. Además, poseen el sistema Ars (resistencia-destoxificación) de arsénico, basado en la reducción de arseniato a arsenito y la excreción utilizando sistemas de transporte específicos. Este sistema se encuentra codificado por el operón ars, su composición genética varía entre especies. Se puede diferenciar dos grupos:

- a. El primer grupo es un operón simple constituido por tres genes arsRBC, los cuales codifican respectivamente un represor transcripcional que responde a arsénico, un transportador de membrana que expulsa arsenito al exterior celular y citoplasmáticamente una enzima arseniato reduce el arseniato a arsenito.

b. El segundo grupo representado por arsRDABC, incrementa la resistencia de la bacteria (Rodríguez, 2013). De tal manera el gen arsA codifica una ATPasa que se acopla al gen ArsB incrementando los niveles de resistencia a arsenito, el consumo de energía del transportador ArsB se convierte en dependiente de ATP. El gen ArsD cumple la función de una metalochaperona que transfiere el arsenito a la subunidad A del complejo ArsAB, mediante tres residuos de cisteína incrementando la afinidad de ArsA por el arsenito (Rodríguez, 2013). El arsénico es integrado al interior de la célula (ver anexo 1 c ) como arseniato utilizando transportadores de fosfato de baja (Pit) o alta (Pst) afinidad y selectividad o arsenito mediante acuaglicerolporinas y varios transportadores de glucosa (Elias, M. Wellner A. Goldin, K. Chabriere, E. Vorholt, J. Erb, T. Tawfik, 2012).

- **Oxidación de arsenito por la enzima arsenito oxidasa (AOX):** El arsenito As (III) es transportado por acuagliceroporinas localizadas en la membrana celular de la bacteria, ingresa mediante un orificio cónico, el cual se encuentra en la superficie de la enzima AOX que es periplasmática. Se ubica entre la membrana interna y externa de la bacteria constituida de dos subunidades: la subunidad mayor es la catalítica, presenta un centro de molibdeno y un centro [3Fe-4S] y, la subunidad menor tiene un centro Rieske [2Fe-2S] que interviene en el proceso de desintoxicación de arsénico realizado por la bacteria (ver anexo 1 d) (Duque Sarango & Díaz, 2016).

La enzima AOX se contacta directamente con el Molibdeno (VI); transfiriendo dos electrones liberados del arsenito, el molibdeno es reducido a molibdeno (IV). A continuación, se transfieren los electrones primero al grupo [3Fe4S] dentro de la subunidad mayor Mo-pterina de la proteína, posteriormente al grupo [2Fe-2S] ubicado en la subunidad menor transfiriendo los electrones a la cadena respiratoria de la membrana interna (Castillo, 2005).

- **Reducción de compuestos de arsénico:** El arseniato a nivel celular se moviliza mediante el transportador de fosfato. Existe la diferencia en la adsorción celular de As (III) y As (V) ya que el As (III) se absorbe directamente en la célula a diferencia del As (V) que entra en competencia con el fosfato para la absorción. El arsénico es reducido por *Pseudomonas aeruginosa* gracias a la presencia del gen ars, el cual se encuentra presente en el cromosoma (Castillo, 2005).

#### 1.4.4. *Trichoderma harzianum*

Se considera como hongo aerobio, ascomiceto (Martínez, Infante, & Reyes Ii, 2013). Presenta una coloración verde, apariencia filamentosa y de vida libre, se encuentra presente en habitantes de materiales vegetales en descomposición y la rizosfera de la planta (Jangir, Pathak, & Sharma, 2017). Su temperatura óptima para el crecimiento de la mayoría de sus especies oscila entre los 25 °C - 30 °C (Jangir et al., 2017).

Posee una alta capacidad de resistencia y tolerancia hacia los metales pesados, capaz de eliminarlos del agua. Se encuentra entre los hongos con la mayor eficiencia de eliminación de As, por la capacidad de esporulación ante la exposición en medios contaminados con arseniato (Siddiquee et al., 2015).

**a. Taxonomía *Trichoderma harzianum***

Reino: Fungi; División: Mycota; Clase: Hyphomycetes; Familia: Moniliaceae; Género: *Trichoderma*; Especie: *harzianum* (Jangir, Monika, Pathak, Ritika, Sharma, Satyawati, 2017).

**b. Características macroscópicas de *Trichoderma harzianum***

Presenta el micelio y esporas, formadas a partir de células desnudas. Produce conidios de color blanco o verde que se encuentran en las ramas de los conidióforos (Jangir et al., 2017) de apariencia algodonosa y presenta un crecimiento rápido en un tiempo de 5 días a 25 °C en condiciones de laboratorio (Chavez, 2006). En los primeros días de desarrollo del hongo las colonias presentan un color blanco, posteriormente en las zonas concéntricas se puede alternar una banda hialina y otra de color verde oscuro. El hongo produce conidios de color blanco en ausencia de luz y de color verde en presencia de luz. Estas colonias al ser expuestas a la luz continua desarrollan un color verde oscuro. En otras ocasiones se pueden tornar verde azulado o amarillo – verde (Martínez et al., 2013). En el crecimiento de su micelio se aprecia la formación de anillos concéntricos, mientras que el reverso de la colonia presenta un pálido color amarillento (Jangir et al., 2017).

**c. Características microscópicas de *Trichoderma harzianum***

Se puede apreciar hifas septadas, hialinas y de paredes lisas con conidióforos altamente ramificados. Por lo general, el ángulo emergente es de 90° respecto a la rama central. Las células conidiógenas conocidas como fialidas se inflan en el centro formando un matraz siendo cilíndricas o prácticamente subglobosas (Jangir et al., 2017).



#### **1.4.5. *Pleurotus ostreatus***

Es considerado como saprófito, se alimenta de materia orgánica (Coello Paredes, 2011). El hongo no presenta anillo ni volva, se le denomina ostra por su forma y color de los cuerpos fructíferos especialmente por la coloración del carpóforo.

El micelio es blanco, longitudinalmente radial, tomándose algodonoso forma una especie de alfombra delgada y firme, el micelio viejo secreta a menudo gotas amarillentas, su píleo no posee una forma específica (Sánchez, 2013). Demuestra un potencial de biosorción eficaz para metales pesados, debido a la acumulación en los cuerpos frutales. Estos hongos crecen cerca de estos sitios contaminados, tienen la capacidad de tolerar altas concentraciones del contaminante (Kapahi & Sachdeva, 2017). La interacción de metales pesados y metaloides, se realiza por la resistencia a los contaminantes a través de su capacidad para sobrevivir en ambientes tóxicos desarrollando una respuesta directa a las especies metálicas involucradas (Siddiquee et al., 2015). Para desintoxicar los iones de metales pesados y metaloides en los sitios contaminados se realiza mediante los procesos (biosorción, captación de metales, inmovilización intracelular de metales, transformación y movilización de metales (ver anexo 4). La captación de metal por biomasa fúngica se realiza en dos estados, el primero es por los hongos vivos donde la captación de metal depende de la actividad metabólica y el segundo proceso implica la captación de metal por hongos muertos mediante los grupos funcionales químicos de la pared celular fúngica durante la captación del metal en el metabolismo de las células en crecimiento (Kapoor & Viraraghavan, 1995).

**a. Taxonomía *Pleurotus ostreatus***

Reino: Fungi; División: Mycota; Clase: Basidiomycetes; Familia: Polyporaceae;  
Género: *Pleurotus*; Especie: *ostreatus* (E. Adebayo & D. Martínez Carrera  
2015).

**b. Características macroscópicas**

El tamaño del micelio del hongo depende de la edad en la que se encuentre varía en un rango de 5 y 15 cm de radio, sus colores varían desde la tonalidad blanca, gris o azulados, pero con el pasar del tiempo empieza a tener un color amarillento, posee un ligero olor anís (Sánchez, 2013).

Su sombrero es redondeado y de superficie lisa, abombado y convexa en los primeros días de vida, con el transcurso de los días madura y se aplanan. En la parte interior del sombrero existe unas laminillas anchas, espaciadas unas de otras dispuestas radialmente como las varillas de un paraguas, que van desde el pie o tallo que lo sostiene hasta el borde, en ellas se producen las esporas destinadas a la reproducción de la especie. Las temperaturas óptimas para el crecimiento del micelio aproximadamente es de 25 °C a 35 °C (Sánchez, 2013).

**c. Características microscópicas**

Microscópicamente se puede observar que el micelio presenta paredes delgadas con fíbulas, siendo una condición dicariótica propia del hongo, en las puntas se puede apreciar basidiosporas de tonalidad grisáceo (Paredes, 2017), esporas alargadas, cilíndricas de tamaño aproximadamente de 7 a 11.5 µm de largo x 3 a 5,6 µm de ancho. Cuando se depositan en gran cantidad forman una un polvillo harinoso de color blanco con tono lila-grisáceo (Coello Paredes, 2011).

#### 1.4.6. *Pseudomonas aeruginosa*

Se encuentran frecuentemente en fuentes de agua natural, aguas residuales y suelos, son responsables de la degradación de compuestos xenobióticos en el ambiente por que poseen dos mecanismos de degradación el hidrolítico y oxidante. El mecanismo oxidante dado por la enzima hidroxilasa es de carácter inducible transforma los contaminantes que presentan peculiaridades de metaloides o metales en metabolitos de menor toxicidad (Castellanos; Rache, 2013).

Posee una matriz acuosa en toda la célula, denominada citosol, la cual contiene todos los organelos, la función es realizar procesos metabólicos como la glucólisis, biosíntesis mediante enzimas (Castellanos; Rache, 2013).

Además, poseen la capacidad de crecer en varios compuestos orgánicos, los cuales son utilizados como fuente de energía y carbono. Son agentes activos de la mineralización de materia orgánica, participan en el ciclo del carbono (Castrejón, Sánchez, E., & Ortiz, 2004).

La membrana externa posee una baja permeabilidad, esta propiedad surge por la competencia ante un nicho ecológico como es el suelo o agua, en los cuales varios microorganismos producen varias sustancias, ha desarrollado la habilidad intrínseca de resistencia a los compuestos secretados por otros microorganismos y contaminantes en ambientes acuáticos (Ruiz, 2007). Presentan un metabolismo aerobio estricto – oxidativo, no realiza el proceso de fermentación de carbohidratos, presenta requerimientos nutricionales sencillos, crecen en agua y secretan sustancias coloridas hidrosolubles, mantienen un metabolismo basal en estas condiciones y producen enzimas hidrolíticas (Soberón, 2015). Son bacterias Gram negativas, oxidasas positivas por que realizan la síntesis de esta enzima (Santaella, 2008).

Presenta una pigmentación relacionada con la palabra *aeruginosa*, que significa “el color del cobre oxidado”, refleja un color característico azul verdoso (piocianina), considerado como un compuesto redox activo, además el color amarillo – verdoso denominado pioverdina, el cual es el principal sideróforo del género *Pseudomonas* (Ruiz, 2007).

El metabolismo general de esta bacteria esta mediado por genes que poseen una secuencia característica denominado factor sigma D, el cual hace que la RNA polimerasa le reconozca. en condiciones de estrés calórico o fase estacionaria de crecimiento, se expresan otros genes que son transcrito por la RNA polimerasa con otros factores sigma, llamados alternativos (Soberón, 2015). Además, incorporan los contaminantes metálicos y no metálicos en sus procesos metabólicos como fuente de energía o carbono. Tolera concentraciones elevadas de arsénico o incluso lo requieren para realizar sus procesos biológicos (Rodríguez Martínez et al., 2017).

Según Pellizzari et al. (2015), observó un buen crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en presencia de As (V), además presenta una buena capacidad para reducir y eliminar el arsénico del agua. Otras experiencias, realizadas con diferentes metales, permitieron comprobar que esta bacteria presenta una formación de biofilm sobre rocas empleadas como lecho de inmovilización.

El proceso de eliminación de As en agua, se realiza por el proceso de biosorción, el cual atrapa el elemento contaminante en la superficie externa de la bacteria sin que existe penetración celular por la presencia de capas de naturaleza proteica en el exterior de la bacteria o biocontención del elemento en estructuras celulares sin sufrir procesos de lisis (Delgado & Mariano, 2011).

**a. Taxonomía de *Pseudomonas aeruginosa***

Reino: Bacteria; Filo: Proteobacteria; Clase: Gamma Proteobacteria; Orden: Pseudomonadales; Familia: Pseudomonadaceae; Género: *Pseudomonas*; Especie: *aeruginosa* (Jawetz, Melnick, & Adelberg, 2010).

**b. Características macroscópicas**

Origina colonias de diferente morfología, con aspecto de mucosa por la formación de una cápsula polisacárida. Se multiplica a una temperatura de 37 a 42 °C; presentan un brillo metálico y un olor a fruta (Santaella, 2008).

Presenta la producción de pigmentos fluorescentes observados bajo luz UV, con una baja longitud de onda de (254 nm), cuando crecen en un medio con limitación de hierro.

**c. Características microscópicas**

Presenta una morfología de bastón, en disposición individual o en pares, tienen un diámetro de 3 a 4  $\mu\text{m}$ , en ocasiones se encuentran formando cadenas cortas, miden aproximadamente 1.5 a 5  $\mu\text{m}$  de largo, presentan un diámetro de 0.5 a 1  $\mu\text{m}$ . Son móviles porque poseen uno o más flagelos polares (Santaella, 2008). La colonia típica es de forma alargada y plana, en el centro presentan una elevación (Ruiz, 2007).

## **Capítulo II**

### **Marco metodológico**

La investigación se desarrolló en dos fases: Fase de campo y fase experimental. La primera se llevó a cabo en la parroquia de Toacaso donde se recolectó las muestras de agua. La fase experimental se realizó en el laboratorio de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana sede Girón y en el Laboratorio de Análisis de Suelos sede Cayambe.

#### **2.1. Fase de Campo**

##### **2.1.1. Georreferenciación**

Se realizó en la parroquia de Toacaso en la provincia de Cotopaxi, a una altura de 3664 m.s.n.m donde se tomaron 16 puntos mediante GPS de marca GARMIN modelo eTrex 30 y se expresó en UTM (Ver anexo 2).

##### **2.1.2. Muestreo de aguas**

Se utilizó la norma INEN 2169 de calidad del agua, muestreo, manejo y conservación de muestras (INEN, 2013). Para esto se tomó 4 muestras de agua en un volumen de 1000 mL en frascos ámbar previamente esterilizado. Se transportó las muestras en un cooler hasta el laboratorio de Análisis de Suelos de la Universidad Politécnica Salesiana sede Cayambe, donde se realizó los análisis físico – químicos, concentración inicial y final de As (ver anexo 3 a).

##### **2.1.3. Muestreo de suelos**

Se tomó 1kg de suelo alrededor de la fuente de agua. Se realizó diluciones en base 10 con 10 g de suelo y 90 mL de agua. Se homogenizó la solución y se procedió a realizar diluciones seriadas hasta  $10^{-6}$ . Se sembró 6 cajas con duplicados de cada dilución, se incubó durante 24 horas para detectar presencia de bacterias y 8 días para hongos.

## **2.2. Fase de Laboratorio**

### **2.2.1. Preparación medios de cultivo**

Se utilizó los medios de cultivo: TSA (Trypteína Soya Agar), TSB (Tryptic Soy Broth) y Agar Cetramide para el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y Sabouraud para *Pleurotus ostreatus* y *Trichoderma harzianum*, se prepararon siguiendo las instrucciones del proveedor.

### **2.2.2. Diluciones seriadas**

Se realizó diluciones seriadas de base 10, con una solución madre de 90 mL de agua destilada estéril y 10 mL de muestra recolectada en un matraz de 250 mL, se agitó por 2 minutos y se obtuvo la solución madre.

Se tomó 1 mL de la solución madre con una micro pipeta y se colocó en un tubo de ensayo que contenía 9 mL de agua destilada, se llevó al vórtex por 30 segundos y se obtuvo la dilución  $10^{-1}$ , posteriormente se tomó 1 mL de la solución  $10^{-1}$  y se colocó en otro tubo de ensayo que contenía 9 mL de agua destilada, obteniendo así a la dilución  $10^{-2}$ , se realizó sucesivamente el proceso hasta obtener la dilución  $10^{-6}$ .

### **2.2.3. Siembra de microorganismos**

- **Siembra** *Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatus*

Se cortó segmentos de 1.0 cm de los hongos, se colocó en cajas Petri que contenían 25 mL de medio Sabouraud e incubó a 25 °C durante 7 días, donde se observó el crecimiento micelial (Ávila Cubillos et al., 2014).

- **Siembra** de *Pseudomonas aeruginosa*

Se tomó una muestra de *Pseudomonas aeruginosa* conservada con el asa microbiológica estéril, se sembró en 5 cajas Petri con TSA, utilizando el método de siembra por estrías, e incubó de forma invertida a 37° C, durante 24 horas (Gamazo 2005).

#### 2.2.4. Purificación de microorganismos

- **Purificación** de *Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatus*

Se empleó 10 cajas Petri que presentaron gran crecimiento micelial, buena coloración y esporulación. Se cortó trozos de micelio de 0.5 cm con ayuda de un bisturí estéril. Se colocó el trozo de micelio del hongo en una nueva caja Petri que contenía 25 mL de medio Saboraud gelificado e incubó a 25 °C durante 7 días.

- **Identificación** de *Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatus*

a. **Identificación macroscópica:** se consideró las características de la colonia, como el color, forma, crecimiento del micelio, olor y posible presencia de exudados (Jangir et al., 2017). Posteriormente se comparó con la taxonomía de Hongos de Watanabe (2002) y Sánchez (2013).

b. **Identificación microscópica:** se utilizó un portaobjetos con una gota de azul de lactofenol, a continuación, con un pedazo de cinta adhesiva se realizó una impronta en el micelio del hongo y se colocó sobre el portaobjetos. Se observó en el microscopio mediante el lente de 4X, 10X y 40X (Jangir et al., 2017). Se encontró las siguientes estructuras microscópicas: los conidióforos erectos, hialinos, ramificados, no verticilados, en grupo o solitarios, fiálides por verticilo de 1 a 5 y en



forma de botella, conidios sub globosos, verdes en los ápices de las fiálides en la especie *Trichoderma harzianum*, siendo comparadas según las claves taxonómicas de Sánchez (2013). Para la especie *Pleurotus ostreatus* se observó estructuras como basidios, basidiósporas circulares e hifas septadas, estas fueron comparadas con las claves taxonómicas de Acosta, Villegas, & Téllez (2016).

- **Identificación de *Pseudomonas aeruginosa***
  - a. **Identificación macroscópica:** mediante observación se tomó en cuenta las características macroscópicas de la colonia como los bordes, la forma, el tamaño, textura, elevaciones y color de la colonia en la superficie del agar TSA. Además, se observó la presencia o ausencia del pigmento azulado no fluorescente piocianina o el pigmento verdoso pioverdina difundido en el medio y se comparó con la bibliografía de (Brooks, G., Carroll, K., Butel, J., Morse, S., & Mietzner, 2014).
  - b. **Identificación microscópica:** se utilizó la guía de López-Jácome (2014) para realizar tinción de Gram se colocó 0.05 mL de agua destilada en el portaobjetos, con el asa estéril se tomó la muestra de la mejor colonia presente, se realizó un frotis al calor para fijar la muestra. Se añadió 2 gotas de cristal violeta por 2 minutos, se lavó con agua destilada para eliminar el colorante, después se aplicó 2 gotas de lugol, se esperó por 2 minutos y se lavó con agua destilada, para decolorar la muestra se añadió 2 gotas de alcohol cetona esperando 30 segundos y se lavó el frotis con agua destilada, para realizar la coloración de contraste se añadió 1 gota de safranina y se esperó 30 segundos, se lavó el frotis con agua destilada cerca del mechero, posteriormente se

observó la muestra al microscopio con los lentes de 10X y 100X se evidenció una coloración rosada - roja y la forma alargada en las células. Estas imágenes fueron comparadas con la taxonomía de (Brooks, G., Carroll, K., Butel, J., Morse, S., & Mietzner, 2014) para identificar las estructuras.

#### **2.2.5. Conservación microorganismos**

- **Conservación de *Pleurotus ostreatus* y *Trichoderma harzianum***

Se utilizó tubos eppendorf previamente estériles, los cuales contenían 1 mL de glicerina al 10 %. Se colocó el inóculo de cada hongo y se llevó a refrigeración a una temperatura de 5 °C por una hora, posteriormente se congeló a -20 °C (Eduardo, Rey, Rubio, Andrei, & Zambrano, 2016).

- **Conservación de *Pseudomonas aeruginosa***

Se tomó con el asa microbiológica varias colonias de una caja Petri y se colocó en el tubo CRYOBANK, con glicerina al 3 % se agitó por 3 minutos, se congeló a -80 °C (Arana, I., Orruño, M., & Barcina, 2010).

#### **2.2.6. Conteo por cámara de Neubauer**

- **Conteo de *Pleurotus ostreatus*, *Trichoderma harzianum***

Se realizó una suspensión de conidios en 50 mL de agua destilada, se adicionó 1 mL de Tween 80 al 0.1 %, en base al procedimiento establecido por Ávila et, al. (2014), con una micropipeta se tomó 1 µL de dilución  $10^{-4}$ , se colocó en la canaleta da cámara de Neubauer a través de sus canales (Bastidas, 2011).

La dilución se dejó reposar por 5 minutos y se contó las conidios en los cuadrados de los cuatro ángulos y el centro (Cañedo & Ames, 2004); se realizó el conteo de conidios al microscopio óptico en el lente 10X de cada

subcompartimento, se contó un total 10 cuadrados, cinco en cada cámara, consecutivamente se empleó la fórmula (Bastidas, 2011).

$$\text{Concentración (UFC/mL)} = (\# \text{ de células} * \text{factor de conteo}) / (\# \text{ de cuadrados contabilizados})$$

**Fórmula 1.** Conteo de cámara de Neubauer

Fuente: (Bastidas, 2011).

Para ajustar las concentraciones se aplicó la fórmula expuesta por Bonilla (2017).

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

**Fórmula 2.** Ecuación para ajustar concentraciones

Fuente: (Bonilla, 2017).

- **Conteo de *Pseudomonas aeruginosa***

Para el conteo se realizó una suspensión de UFC en 50 mL de agua destilada y se procedió a realizar diluciones seriadas con el procedimiento establecido por Ávila et, al. (2014). Con una micropipeta se tomó 1 µL de dilución  $10^{-5}$ , se colocó en la canaleta da cámara de Neubauer a través de sus canales (Bastidas, 2011). La dilución se dejó reposar por 5 minutos y se contó las UFC en los cuadrados de los cuatro ángulos y el centro (Cañedo & Ames, 2004).

El conteo de UFC se realizó con ayuda del microscopio óptico en el lente 10 X de cada subcompartimento, se contó un total 10 cuadrados, cinco en cada cámara, consecutivamente se empleó la fórmula Gamazo, (2005).

$$\text{UFC/ mL} = \# \text{ de colonias} * \text{factor de dilución} / \text{mL sembrados en placa}$$

**Fórmula 3.** Número inicial de UFC/mL de muestra.

Fuente: (Gamazo, 2005).

### 2.2.7. Preparación de inóculos

- **Inóculo de *Trichoderma harzianum***

Se utilizó agua destilada con Tween 80 al 0.1 % se realizó un lavado interno de 10 cajas Petri las cuales contenían el hongo desarrollado en las condiciones previamente mencionadas, con el objetivo de desprender las esporas del medio de cultivo. Con ayuda de un embudo estéril, se recolectó el líquido obtenido del lavado interno de las cajas Petri, en un frasco boheco de 1000 mL. El inóculo obtenido se agitó por 3 minutos (Doroteo, 2007). Se ajustó a la concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/mL.

- **Inóculo de *Pleurotus ostreatus***

Se realizó en una cámara de flujo laminar, mediante un bisturí estéril se desprendió el micelio del agar. El micelio se colocó en un frasco boheco de 1000 mL que contenía 300 mL de agua destilada estéril. Posteriormente se realizó el recuento de conidios en cámara Neubauer ajustando a la concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/mL.

- **Inóculo de *Pseudomonas aeruginosa***

Se utilizó el protocolo de Gamazo (2005). Se seleccionó varias colonias de *Pseudomonas aeruginosa* previamente aisladas a través el método de siembra en placa de a dilución  $10^{-5}$ , mediante el asa microbiológica se tomó una porción de colonias *Pseudomonas aeruginosa*, se incorporó a un tubo de ensayo con 25 mL TSB y se agitó en un vortex durante 2 minutos, se incubó durante 24 días a 37 °C. Se agregó los 25 mL TSB de un tubo inoculado al frasco boheco estéril aforándolo a 1000 mL con agua destilada estéril. Finalmente se determinó la concentración del inóculo bacteriano mediante la fórmula de Gamazo (2005).

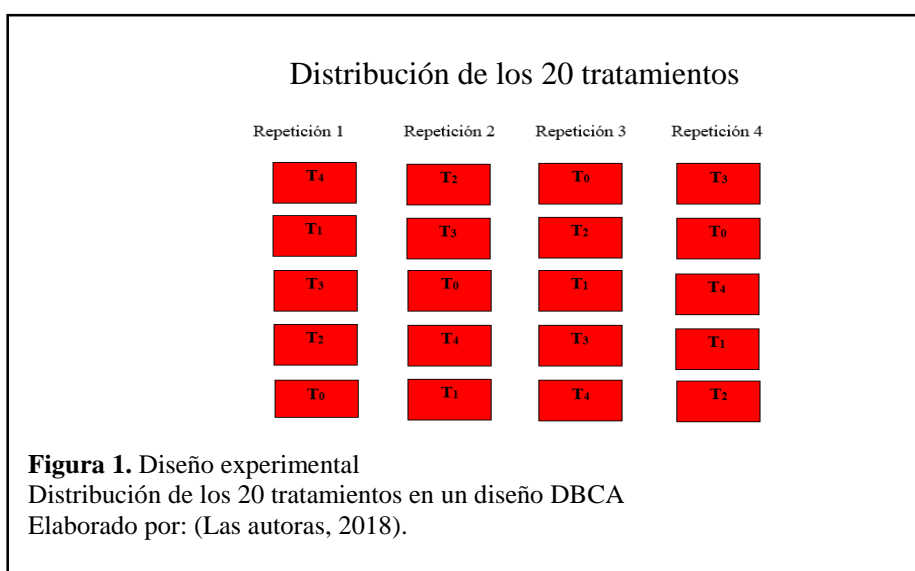
- **Inóculo del consorcio microbiano**

Se tomó 333,3 mL de cada inóculo (*Trichoderma harzianum*, *Pleurotus ostreatus* y *Pseudomonas aeruginosa*) con una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/mL, se mezcló en frasco boheco de 1000 mL estéril.

## 2.3. Montaje del experimento

### 2.3.1. Diseño experimental

Se utilizó un diseño de bloques completamente al azar (DBCA) constituido con 5 tratamientos y 4 repeticiones y se obtuvo 20 unidades experimentales dispuestas al azar (ver figura 1).



### 2.3.2. Preparación de los contenedores

Se utilizó 20 contenedores plásticos transparentes rectangulares con tapa, marca consuplast de capacidad 12 L, con dimensiones: 42 cm de largo, 29 cm de ancho y 16,5 cm de profundidad, Se codificó en la parte central de tapa del contenedor identificando el tratamiento perteneciente con la siguiente nomenclatura T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> respectivamente.

Posteriormente se realizó un orificio central en la parte superior de la tapa con ayuda de un caudín, en el orificio se adaptó la manguera plástica delgada transparente, la cual estuvo conectada a un motor de oxigenación el mismo que pasó conectado las 24 h por 3 meses, permitiendo así el ingreso de oxígeno a las unidades experimentales respectivamente.

### 2.3.3. Preparación de las unidades experimentales

El agua muestreada en la fase de campo se vertió en un contenedor de 200 L aproximadamente, logrando homogenizar todas las muestras recolectadas en los diferentes puntos, posteriormente con ayuda de un balde, se dispensó el agua aproximadamente 6 L en cada unidad experimental.

### 2.3.4. Aplicación de los inóculos

La aplicación de los inóculos en cada tratamiento aplicado a las unidades experimentales se realizó dos veces por semana los días martes y jueves por tres meses.

### 2.3.5. Tratamientos del ensayo

**Tabla 1.**

Tratamientos aplicados a las unidades de experimentación.

Tratamiento	Contenido	Concentración del inóculo
T <sub>0</sub>	Agua contaminada con arsénico.	---
T <sub>1</sub>	Agua contaminada con arsénico + <i>Trichoderma harzianum</i> .	10 <sup>6</sup> UFC/μL de solución
T <sub>2</sub>	Agua contaminada con arsénico + <i>Pleurotus ostreatus</i> .	10 <sup>6</sup> UFC/μL de solución
T <sub>3</sub>	Agua contaminada con arsénico + <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	10 <sup>6</sup> UFC/μL de solución
T <sub>4</sub>	Agua contaminada con arsénico + <i>Trichoderma harzianum</i> + <i>Pleurotus ostreatus</i> + <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	10 <sup>6</sup> UFC/μL de solución

Nota: Elaborado por: (Las autoras, 2018).

### **2.3.6. Variables del ensayo**

- **Temperatura y conductividad eléctrica**

Se realizó el monitoreo dos veces por semana durante el tiempo que duró la fase de experimentación. Se midió con un termo hidrómetro, el cual fue introducido en el agua por dos minutos hasta que el resultado obtenido se estabilice en la pantalla del equipo. Se expresó en °C y ds/m respectivamente.

- **Potencial de Hidrógeno**

Se realizó el monitoreo dos veces por semana. Se introdujo el electrodo del pH - metro en el agua durante 2 minutos en todos los tratamientos. Las lecturas fueron registradas y expresadas en unidades de pH.

### **2.4. Análisis Físicoquímicos**

Se realizó al inicio y al final del ensayo en los laboratorios de suelos y agua del centro de apoyo de Cayambe de la Universidad Politécnica Salesiana. Se analizó los siguientes parámetros físicos - químicos: nitratos, amonio, fosfatos, K, Cloruros, As, relación absorción de Na, sólidos totales, oxígeno disuelto, DBO, DQO, conductividad eléctrica, turbidez, color, sulfatos, dureza total, Ca, Mg, Na, Fe, Cu, Mn, Zn, B, coliformes totales, coliformes fecales basados en procedimientos estandarizados internacionales (ver anexo 3b).

#### **2.4.1. Análisis de la concentración de As**

Se analizó al inicio y al final del ensayo, la concentración de As en µg/L mediante el método de valoración SM. 3114 los laboratorios de suelos y agua del centro de apoyo de Cayambe de la Universidad Politécnica Salesiana (ver anexo b).

## **2.5. Análisis estadístico**

Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) con Tukey al 5 %, mediante el programa InfoStat. Para los análisis de concentración de As se comparó los resultados iniciales y al final del ensayo. Además se aplicó la fórmula [raíz cuadrada + 1 ( $\sqrt{x} + 1$ )], con el objetivo de tener una distribución normal y reducir el coeficiente de variación (Fernández & Pértega, 2001).



## Capítulo III


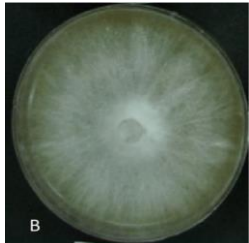
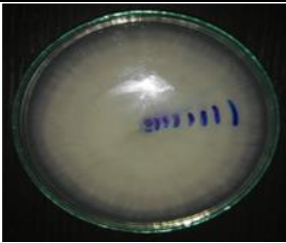
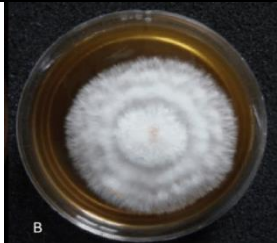
### Resultados y discusión

#### 3.1. Identificación de *Pleurotus ostreatus*

##### 3.1.1. Identificación macroscópica

**Tabla 2.**

Identificación macroscópica de *Pleurotus ostreatus*

Características	Laboratorio	Referencia bibliográfica
Coloración y textura del micelio	 Fuente: (Las autoras, 2018).	 Fuente: (Acosta et al., 2016).
Crecimiento del micelio	 Fuente: (Las autoras, 2018).	 Fuente: (Acosta et al., 2016).

Elaborado por: (Las autoras, 2019).

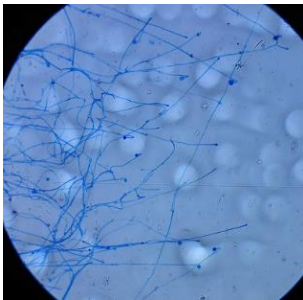
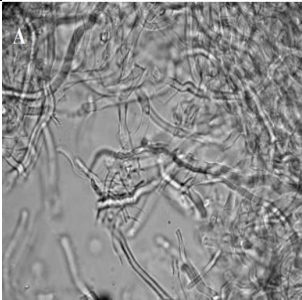

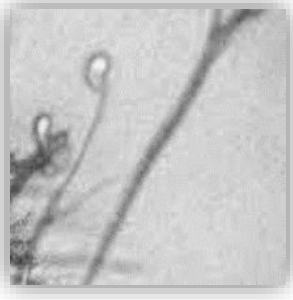
En la tabla 2, las imágenes en la columna de la izquierda se observa las características macroscópicas obtenidas en el ensayo del laboratorio, en la primera imagen se evidencia el crecimiento del micelio con una coloración blanca de textura algodonosa con la formación de anillos concéntricos y una distancia de 5 mm de crecimiento entre cada anillo. En la columna de la derecha se encuentra la referencia bibliográfica descrita por Acosta, Villegas, and Téllez (2016), en la que se ve que el crecimiento micelial de *Pleurotus ostreatus* es de color blanquecina con tonos amarillos, grises y azules, textura algodonosa, con presencia de anillos concéntricos.

De esta manera se demuestra que la especie analizada en el ensayo coincide con las características de *Pleurotus ostreatus*.

### 3.1.2. Identificación microscópica

**Tabla 3.**

Identificación microscópica de *Pleurotus ostreatus*

Estructuras	Laboratorio	Referencia bibliográfica
Sistema Micelial	 <p data-bbox="608 1048 916 1077">Fuente: (Las autoras, 2018).</p>	 <p data-bbox="1061 1048 1299 1077">Fuente: (Perez,2006).</p>
Basidios	 <p data-bbox="608 1424 916 1453">Fuente: (Las autoras, 2018).</p>	 <p data-bbox="1061 1451 1299 1480">Fuente: (Perez,2006).</p>

Elaborado por: (Las autoras, 2019).

En la tabla 3, las imágenes de la columna izquierda obtenidas en el laboratorio, en el cual se observa el micelio de 5 cm de radio (Sánchez, 2013), disperso similar a una telaraña de hifas finas y alargadas con la formación de pequeñas esporas, presenta hifas hialinas septadas delgadas. La imagen de basidios de la columna de la izquierda presenta características elipsoidales, todas estas características coinciden con la descripción según Perez, (2006) en sus estudios acerca de características de *Pleurotus*

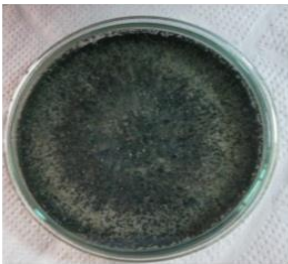

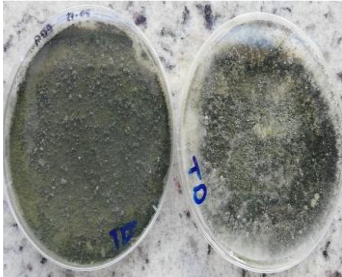
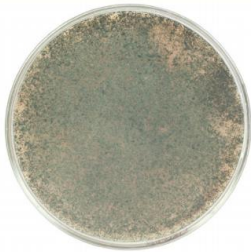
*ostreatus*. Por lo tanto, se establece que la morfología de las estructuras obtenidas en el laboratorio concuerda con lo reportado por los autores evidenciando que el hongo aislado es *Pleurotus ostreatus*.

### 3.2. Identificación de *Trichoderma harzianum*

#### 3.2.1. Identificación macroscópica

**Tabla 4.**

Identificación macroscópica de *Trichoderma harzianum*

Características	Laboratorio	Referencia bibliográfica
Formación de anillos concéntricos	 Fuente: (Las autoras, 2018).	 Fuente: (Borrero & H, 2005).
Coloración del micelio	 Fuente: (Las autoras, 2018).	 Fuente: (Las autoras, 2018).

Elaborado por: (Las autoras, 2019).

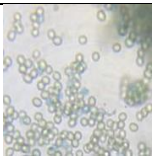
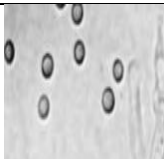

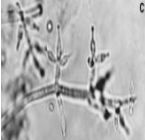
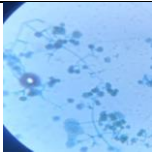
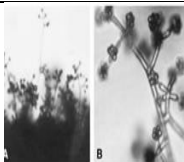

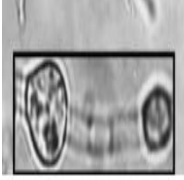
En la tabla 4 , las imágenes de la columna de la izquierda pertenecen a los resultados obtenidos en laboratorio, en las cajas Petri se evidenció a los 8 días de incubación a una temperatura de 25 °C un crecimiento micelial en forma de anillos concéntricos y esporulación densa de color verde oscuro, características que coinciden según lo expresado por Borrero & H, (2005) y Castro & Rivillas, (2012) describe macroscópicamente un rápido crecimiento y coloraciones blancas, verde azulado o

amarillo verdosas con anillos concéntricos que comparados con las imágenes de la columna derecha, se comprueba que la especie aislada es *Trichoderma harzianum*.

### 3.2.2. Identificación microscópica

**Tabla 5.**

Identificación microscópica de *Trichoderma harzianum*

Estructuras	Laboratorio	Referencia bibliográfica
Esporas	 Fuente: (Las autoras, 2018).	 Fuente: (Watanabe, 2002).
Fiálides	 Fuente: (Las autoras, 2018).	 Fuente: (Watanabe, 2002).
Conidióforos	 Fuente: (Las autoras, 2018).	 Fuente: (Watanabe, 2002).
Conidios	 Fuente: (Las autoras, 2018).	 Fuente: (Watanabe, 2002).

Elaborado por: (Las autoras, 2019).

En la tabla 5, las imágenes de la izquierda pertenecen a los resultados obtenidos en el laboratorio, se muestra la presencia de esporas agrupadas con morfología ligeramente redondeada; las fiálides tienen forma de botella; los conidióforos hialinos, ramificados

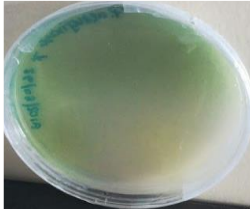
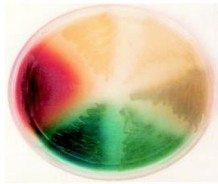
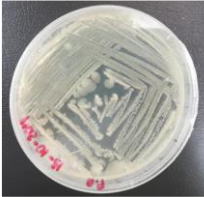
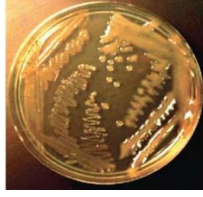


con forma de árboles. En la columna de la derecha se observan imágenes de referencia según Watanabe, (2002) describe a *T. harzianum* con la presencia de conidias hialinas ovoides, fiálides en forma de botella agrupadas, conidióforos hialinos, en posición vertical, muy ramificado en racimos, demostrándose que el hongo es *Trichoderma harzianum*.

### 3.3. Identificación de *Pseudomonas aeruginosa*

#### 3.3.1. Identificación macroscópica

**Tabla 6.**

Identificación macroscópica de *Pseudomonas aeruginosa*

Características	Laboratorio	Referencia bibliográfica
Formación de pigmentos amarillo – verdoso (pioverdina)	 Fuente: (Las autoras, 2018).	 Fuente: (Montero, 2012).
Color de la colonia cremoso, brillo metálico	 Fuente: (Las autoras, 2018).	 Fuente: (Montero, 2012).
Colonias redondas	 Fuente: (Las autoras, 2018).	 Fuente: (Ruiz, 2007).

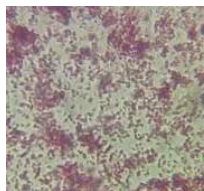

Elaborado por: (Las autoras, 2019).

En la tabla 6, las imágenes de la columna de la izquierda pertenecen a los resultados obtenidos en laboratorio, transcurrido 24 horas de incubación a una temperatura de 37 °C se aprecia en la primera imagen la coloración amarillo verdosa denominada piocianina sustancia propia del género *Pseudomonas*, se compara con la imagen de Montero (2012) confirmando que la bacteria es la de interés. Además presenta un crecimiento masivo de colonias con características de color crema, morfología redonda, brillante sin bordes es así que se corrobora que la morfología típica de *Pseudomonas aeruginosa* es plana y alargada con una leve elevación en el centro como se observa en la columna derecha (Ruiz, 2007).

### 3.3.2. Identificación microscópica

**Tabla 7.**

Identificación microscópica de *Pseudomonas aeruginosa*

Características	Laboratorio	Referencia bibliográfica
Tinción Gram	 <p>Fuente: (Las autoras, 2018).</p>	 <p>Fuente: (Santambrosio, Ortega, &amp; Garibaldi, 2009).</p>

Elaborado por: (Las autoras, 2019).

En la tabla 7, la imagen de la columna de la izquierda pertenece a los resultados obtenidos en laboratorio la cual indica la morfología de un bacilo Gram negativo (Santambrosio, Ortega, and Garibaldi, 2009).

Además Santaella (2008) menciona que pueden medir  $\mu\text{m}$  0.60 x 2  $\mu\text{m}$  y su disposición puede ser individual, en cadenas cortas o pares, al comparar las dos imágenes se ratifica que la bacteria es *Pseudomonas aeruginosa*.

### 3.4. Análisis estadístico de las variables del ensayo

#### 3.4.1. Temperatura

**Tabla 8.**

Análisis de varianza para la variable Temperatura y Tuckey al 5 %

Tratamiento	Promedio Temperaturas (°C)	p-valor	C.V. (%)	Rango	Significancia
T <sub>0</sub>	17.81	0.0420	3.34	A	NS
T <sub>2</sub>	17.93			A	
T <sub>1</sub>	17.94			A	
T <sub>3</sub>	17.96			A	
T <sub>4</sub>	18.00			A	

Nota: CV: coeficiente de variación; T<sub>0</sub>: Agua contaminada con arsénico; T<sub>1</sub>: Agua contaminada con arsénico + *Pleurotus ostreatus*; T<sub>2</sub>: Agua contaminada con arsénico + *Trichoderma harzianum*; T<sub>3</sub>: Agua contaminada con arsénico + *Pseudomonas aeruginosa*; T<sub>4</sub>: Agua contaminada con arsénico + *Pleurotus ostreatus* + *Trichoderma harzianum* + *Pseudomonas aeruginosa*.

NS: No significativo

Elaborado por: (Las autoras, 2019).

En la tabla 8 se observó que las temperaturas de los tratamientos oscilaron entre 17.81 °C a 18.00 °C, estas variaciones se presentaron a nivel general en los tratamientos ya que las condiciones del ensayo fueron homogéneas. El CV fue de 3.34 % el cual dio confiabilidad a los datos y el valor se encontró dentro de los parámetros óptimos para este tipo de ensayo experimental. Al aplicar Tukey al 5 % se observó que no existe diferencia significativa lo que indicó que todos los tratamientos presentaron un comportamiento similar con un rango de significancia “A”.

Los tratamientos presentaron temperaturas óptimas que permitieron el crecimiento de *P. ostreatus*, *T. harzianum* y *P. aeruginosa* considerados como microorganismos

mesófilos por ello la temperatura obtenida facilitó el flujo de nutrientes y la activación de sus procesos metabólicos para la biorremediación de As en agua los cuales se evidencian en los resultados obtenidos. Así lo ratifica Durairaj (2017) al mencionar que el rango de 15 °C - 45 °C es aceptable para que las bacterias y hongos activen sus funciones metabólicas en procesos de Biorremediación de As en agua, puesto que influye en la velocidad de crecimiento de los microorganismos al acelerar o detener los mecanismos de transporte de nutrientes y el gradiente de protones.

Así el T<sub>4</sub> presentó la temperatura máxima de 18 °C, en tal sentido se realizó la interacción entre hongos y bacteria a través de la activación de sus metabolismos generando productos secundarios que ocasionaron un cambio en la coloración del agua de amarillo a marrón. Según Varela (2008) menciona que a temperaturas de 18 °C en adelante se produce cambios de coloración en el medio líquido por activación de procesos metabólicos en los consorcios; T<sub>3</sub> con 17.96 °C, no se encontró dentro de las temperaturas ideales para *P. aeruginosa*, por lo que hace que su metabolismo sea menor para transformar el As, en efecto para realizar el mecanismo de biosorción se requiere temperaturas mayores a la obtenida y un tiempo de adaptación de seis meses. Según Collantes and Castillo (2015) al estudiar la aplicación de la biosorción en la remoción de As en agua, determinaron que valores menores a los parámetros establecidos como ideales 25 °C a 35 °C, reducen la capacidad de retención de los adsorbentes de *P. aeruginosa*; T<sub>1</sub> con 17.94 °C, esta temperatura facilitó el crecimiento del micelio junto a las funciones metabólicas, esto se evidenció por la presencia algodonosa propia del hongo la cual cubrió la base interna del contenedor y la superficie del agua. Al respecto Loynaz (2014) menciona que *P. ostreatus* en agua requiere parámetros de 16 °C a 18 °C para reducir la concentración de As mediante la colonización del medio líquido con su micelio; T<sub>2</sub> con 17.93 °C, presentó el menor



valor de temperatura esto provocó un crecimiento lento del micelio del hongo que se evidenció por la formación de una nata verdosa en la superficie del agua en el segundo mes del ensayo debido a que es un hongo saprófito que presenta un mejor crecimiento en sustratos sólidos y considerándose activo metabólicamente al generar un aroma similar a coco. Según Jangir, Pathak y Sharma (2017) mencionan que el micelio en agua de *T. harzianum* crece más rápido en rangos de 25 °C - 30 °C en estudios experimentales al presentarse como una capa de membrana verdosa. Además Poalacin, (2015) ratifica que las actividades metabólicas de *T. harzianum* se confirman cuando este suelta un aroma a coco, según Rocha, (2005) este aroma se debe a la presencia de la 6 - Pentil  $\alpha$  pirona que es una lactona que emana un olor a coco.

### 3.4.2. Conductividad Eléctrica

**Tabla 9.**

Análisis de varianza para la variable Conductividad eléctrica y Tuckey al 5%

Tratamiento	Promedio conductividad Eléctrica (ds/m)	p-valor	C.V. (%)	Rango	Significancia
<b>T<sub>1</sub></b>	0.119	<0.0001	3.31	A	NS
<b>T<sub>3</sub></b>	0.121			A	
<b>T<sub>2</sub></b>	0.123			A	
<b>T<sub>4</sub></b>	0.125			A	
<b>T<sub>0</sub></b>	0.143			A	

Nota: CV: coeficiente de variación; T<sub>0</sub>: Agua contaminada con arsénico; T<sub>1</sub>: Agua contaminada con arsénico + *Pleurotus ostreatus*; T<sub>2</sub>: Agua contaminada con arsénico + *Trichoderma harzianum*; T<sub>3</sub>: Agua contaminada con arsénico + *Pseudomonas aeruginosa*; T<sub>4</sub>: Agua contaminada con arsénico + *Pleurotus ostreatus* + *Trichoderma harzianum* + *Pseudomonas aeruginosa*.

**NS:** No significativo

Elaborado por: (Las autoras, 2019).

En la tabla 9 se observó que las conductividades eléctricas de los tratamientos oscilaron entre 0.119 ds/m a 0.143 ds/m. El CV fue de 3.31 % valor que establece la confiabilidad de los datos. Al aplicar Tukey al 5 % se observó que no existe diferencia significativa lo que indicó que todos los tratamientos presentan un comportamiento similar con un rango de significancia “A”.

La conductividad inicial presentó un valor de 0.49 ds/m durante el ensayo se presentó una disminución paulatina debido a la pérdida de iones presentes en el agua al aplicar los tratamientos porque se activa el metabolismo microbiano. Los valores que se presentan en cada tratamiento se encontraron sobre del límite permisible para el uso de aguas de riego. Según TULAS (2011) especifica un valor de 0.1 ds/m el cual establece que el agua es apta para el uso en actividades agrícolas.

T<sub>1</sub> presentó el valor más bajo de conductividad eléctrica con 0.119 ds/m esto indicó que la actividad metabólica fue mayor por *P. ostreatus*, como se puede inferir el hongo colonizó gran parte del contenedor y para esto debió consumir la mayor cantidad de nutrientes presentes en el agua, evidenciando la reducción de la conductividad eléctrica. Según Deshmukh, Khardenavis y Purohit (2016) mencionan que para alcanzar un rápido crecimiento el hongo tiende a alimentarse de elementos presentes en el medio líquido considerando la siguiente relación: Menor cantidad de elementos menor conductividad eléctrica; T<sub>3</sub> con 0.121 ds/m generó precipitados color negro similar al carbón molido lo que indica la alteración del medio líquido evidenciando la activación metabólica de la bacteria por lo tanto disminuye la conductividad y aumenta la capacidad de retención de los adsorbentes presentes en la membrana celular. Según Varela (2008) menciona que la presencia de precipitados se justifica por el aumento de protones ligados a las paredes celulares de *P. aeruginosa* los cuales aumentan el

punto isoelectrico facilitando el acceso de aniones a lugares cargados positivamente, además se genera la saturación de las estructuras celulares con iones de As, la cual afecta el metabolismo bacteriano por lo tanto no se logra la reducción eficiente de la concentración de As.

### 3.4.3. Potencial de Hidrógeno

**Tabla 10.**

Análisis de varianza para la variable pH y Tuckey al 5%

Tratamiento	Promedio pH Final	p-valor	C.V.	Rango	Significancia
T <sub>3</sub>	8.06	<0,0001	3.38	A	NS
T <sub>1</sub>	8.31			A	
T <sub>2</sub>	8.33			A	
T <sub>4</sub>	8.37			A	
T <sub>0</sub>	9.47			A	

Nota: CV: coeficiente de variación; T<sub>0</sub>: Agua contaminada con arsénico; T<sub>1</sub>: Agua contaminada con arsénico + *Pleurotus ostreatus*; T<sub>2</sub>: Agua contaminada con arsénico + *Trichoderma harzianum*; T<sub>3</sub>: Agua contaminada con arsénico + *Pseudomonas aeruginosa*; T<sub>4</sub>: Agua contaminada con arsénico + *Pleurotus ostreatus* + *Trichoderma harzianum* + *Pseudomonas aeruginosa*.

NS: No significativo

Elaborado por: (Las autoras, 2019).

En la tabla 10 se observó que el potencial de hidrógeno de los tratamientos osciló entre 8.06 pH a 9.47 pH. El CV fue de 3.38 % valor que estableció la confiabilidad de los datos. Al aplicar Tukey al 5 % se observó que no existe diferencia significativa lo que indicó que todos los tratamientos presentaron un comportamiento similar con un rango de significancia “A”.

Los tratamientos presentaron pH básicos a nivel general que permitieron el crecimiento de los microorganismos, esto se evidenció al ver cambios de color en los

diferentes tratamientos y un aumento paulatino de los valores registrados, los mismos que se encuentran dentro del rango óptimo para la Biorremediación de metales pesados en agua indicando que los microorganismos realizaron procesos metabólicos que cambiaron la composición del agua, así lo ratifica Durairaj (2017) al mencionar que dichos valores fluctúan entre 5.5 pH – 9.0. pH para el crecimiento de los microorganismos y degradación de As.

Así T<sub>4</sub> con un pH de 8.3 permitió el crecimiento de los hongos y la bacteria del consorcio microbiano mediante el consumo de nutrientes y activación de sus actividades metabólicas, no obstante, el pH ideal en agua para degradar metales es de 2.0 para consorcios microbianos. Pese a este factor se pudieron observar cambios en la consistencia y color del agua. Pues la transformación de arseniatos a arsenitos puede darse en pH básicos, pero no es un indicador de degradación total si no parcial. Según Collantes y Castillo (2015) mencionan que la mayor remoción de metaloides se realizan a pH 2 (ácido) y a su vez Montoya & Balagurusamy (2015) establecen que los cambios de pH de ácido a básico indican una reducción de toxicidad del As, sin asegurar la degradación total o parcial del mismo.

T<sub>2</sub> con un pH de 8.33 no permitió la rápida adaptación del hongo en el agua esto se evidencia al ver un precipitado de biomasa en la base del contenedor, además *Trichoderma* al ser un saprofito de suelo, trabaja mejor en este recurso. Así Chavez (2006) recomienda rangos de 4.6 pH a 6.8 pH para potenciar el crecimiento, adaptación y activación metabólica del hongo en agua para realizar el proceso de remoción de la concentración de As.

T<sub>1</sub> con un pH de 8.31 permitió una rápida adaptación de *P. ostreatus* en el agua por la presencia y la rápida colonización de los micelios en el contenedor lo que provocó una activación del hongo con la presencia del aroma similar al anís.

Así lo confirma Laursen (2018) al determinar como pH óptimo los valores comprendidos entre 7 pH a 9 pH que favorecen la pronta adaptación del hongo y por lo mismo la activación de los mecanismos de remoción de As, además menciona la generación de aromas anisados cuando el hongo se encuentra en su máxima actividad metabólica produciendo metabolitos secundarios ante la degradación del As.

T<sub>3</sub> con un 8.06 pH, favorece la actividad metabólica de *P. aeruginosa* porque en estas condiciones permite la activación de la enzima reductasa, y el mecanismo de destoxificación; cumple con el valor considerado como ideal gracias a una estrategia de destoxificación, sin embargo presenta un bajo porcentaje de Biorremediación del metal posiblemente por la falta de tiempo para adaptación de la bacteria que es de seis meses; la temperatura adecuada; la disminución del potencial de hidrógeno inicial de 9.2, disminución de cloruros, fosfatos, Mg, Na y Fe y el incremento de Ca, en base a los análisis realizados al inicio y al final, lo que se comprueba el consumo de nutrientes por parte de la bacteria. Según Collantes & Castillo (2014). determinan que *P. aeruginosa* expuesta a pH básicos en agua puede reducir As<sup>V</sup> y As<sup>III</sup> en condiciones aeróbicas, mediada por una enzima reductasa soluble contenida en el citoplasma, además un indicador de la actividad metabólica es la disminución de la cantidad de nutrientes.

### 3.4.4. Análisis de la concentración final de As con Tuckey al 5% y porcentaje de remoción de cada tratamiento

**Tabla 11.**

Análisis de la concentración final de As con Tuckey al 5% y porcentaje de remoción de cada tratamiento

Concentración inicial de As (mg/L) Base Iliniza	Límite permisible de As (mg/L)	Tratamiento	Concentración Final As (mg/L)	Rango	Remoción (%)	p-valor	C.V.	Significancia
0.70	0.20	T <sub>1</sub>	0.22	A	68.55	0.0165	5.69	*
		T <sub>2</sub>	0.35	A B	43.36			
		T <sub>4</sub>	0.36	A B	48.04			
		T <sub>3</sub>	0.58	B	1.12			
		T <sub>0</sub>	0.70	-	0.00			

Nota: CV: coeficiente de variación; T<sub>0</sub>: Agua contaminada con arsénico; T<sub>1</sub>: Agua contaminada con arsénico + *Pleurotus ostreatus*; T<sub>2</sub>: Agua contaminada con arsénico + *Trichoderma harzianum*; T<sub>3</sub>: Agua contaminada con arsénico + *Pseudomonas aeruginosa*; T<sub>4</sub>: Agua contaminada con arsénico + *Pleurotus ostreatus* + *Trichoderma harzianum* + *Pseudomonas aeruginosa*.

\*: Significativo

Fuente: (Las autoras, 2019).

En la tabla 11 se observó el porcentaje de remoción y la concentración final de As presente en el ensayo. El CV fue de 5.69 % que determinó la confiabilidad de los datos.

Al aplicar Tukey al 5 % presentó diferencia significativa lo que indicó que los tratamientos presentaron comportamientos diferentes, con rangos de significancia representados por: T<sub>1</sub> categorizado con la letra “A”; T<sub>2</sub> y T<sub>4</sub> comparten la categoría con las letras “AB”; T<sub>3</sub> categorizado con la letra “B”.

T<sub>1</sub> con 68.55 % presenta el mayor porcentaje de remoción de la concentración de As debido a que las condiciones de temperatura, potencial de hidrógeno y conductividad eléctrica estuvieron dentro de los rangos óptimos permitiendo que *P. ostreatus* se expanda en el agua con gran velocidad a través de sus micelios, activando el mecanismo de biosorción para la reducción de la concentración de As en agua mediado por las paredes fúngicas que contienen gran cantidad de quitina la cual posee varios grupos carboxílicos, amino, tiol, fosfato e hidróxido en la pared celular que ayudan en el mecanismo de biosorción de As. Según Cumbal, Duchicela y Navas ( 2015) mencionan que el proceso de remoción de As a través de la pared celular de los hongos se da por los grupos funcionales de los alcoholes primarios (-CH<sub>2</sub>OH) de la quitina, quitosano, β(1-3) glucanos, galactosamina, glucosamina, y otros polisacáridos constituyentes de la pared de las células fúngicas participando en la captura de los iones arsenato con los grupos hidroxilos (OH) de los alcoholes primarios que son altamente reactivos, esto produce la liberación del grupo OH<sup>-</sup> y deja al CH<sup>2+</sup> como un carbocatión que mediante atracción electrostática forma un enlace con el anión H<sub>2</sub>AsO<sup>4-</sup>, produciendo la liberación del OH<sup>-</sup> por parte del alcohol, los grupos funcionales hidroxilos pueden reemplazar los grupos OH<sup>-</sup> por los aniones arsenato en la superficie de los polisacáridos; Kapahi & Sachdeva (2017) mencionan en sus estudios el gran potencial que posee la biomasa de *P. ostreatus* como biosorbente por sus excelentes propiedades de unión a iones, tolerancia y resistencia en aguas contaminadas con As generando ventaja sobre el resto de los tratamientos, por lo tanto *P. ostreatus* es el tratamiento con mayor posibilidad de reducir arsénico de las aguas contaminadas de la comunidad de Toacaso.

T<sub>4</sub> con 48.04 % presentó transformación de As al observarse cambios en la consistencia del agua generando bifilms (capa de nata) con olor desagradables debido a los mecanismos de defensa de los microorganismos ante el As. Según Salgado, Durán, Cruz, Carballo, & Martínez (2012) mencionan que un consorcio microbiano presenta capas de biofilm cuando se encuentra activo, además que se debe contar con un periodo de aclimatación que le ayude a alcanzar una carga microbiana que le permita generar su potencial biorremediador en conjunto y no de manera individual.

El T<sub>2</sub> con 43.36 % indicó una baja adaptación y crecimiento del hongo esto se debe a que el pH y la temperatura no fueron las más adecuadas para que este hongo saprófito del suelo active su potencial metabólico de manera eficiente reduciendo poca cantidad de As, así Poalacin (2015) sugiere que un pH ácido potencia el metabolismo del hongo hacia el As. Además Chavez (2006) expresa que el hongo no funciona de manera efectiva en medios líquidos debido a que la presencia del agua afecta la germinación de las esporas por lo tanto afecta el crecimiento del tubo germinal y del micelio retardando la adaptación y proceso de biosorción hacia el As

T<sub>3</sub> con 1.12 %, presenta el menor porcentaje de remoción de la concentración As con un rendimiento de biodegradación deficiente sin embargo se observa que las muestras de agua inoculadas con *P. aeruginosa* fueron las más cristalinas en relación a las otras muestras, además la adaptación y resistencia de la bacteria le permite colonizar ambientes contaminados con As. Según Martín (2004) menciona que la presencia de genes reguladores(arsRA, arsRB, arsRC, arsRD) responsables de coordinar la respuesta a cambios ambientales, la bacteria posee el genoma más largo que se ha secuenciado hasta el momento.



El ensayo es viable para procesos de Biorremediación, según Aznar (2011) establece que las aguas son fácilmente biorremediables sí al realizar la división entre los parámetros DBO / DQO se obtiene como resultado un valor menor a 0.5, esto indica que el ensayo es viable pues en los análisis realizados en la muestra de agua de Toacaso al hacer la relación de los parámetros mencionados el cociente obtenido es 0.4.

A pesar de obtener remoción de As en todos los tratamientos se evidencia que los mejores resultados los presenta el T<sub>1</sub> conformado por *Pleurotus ostreatus* al poseer la menor concentración final de 0.22 ppm y el mayor porcentaje de remoción 68.55 % de As. Según TULAS (2011) los límites permisibles van desde 0.20 ppm o mg/L para uso pecuario y 0.10 ppm o mg/L para riego, esto nos indica que el agua de Toacaso aún no se puede usar al no estar dentro de los parámetros indicados, la posible causa es el corto tiempo de aplicación del ensayo.

## Conclusiones

- *P. ostreatus* posee una buena capacidad biorremediadora a través del proceso de biosorción con 68.5 % de remoción de la concentración de As respecto a lo demás tratamientos, siendo un basiodimicete que trabaja bien en agua, pese que su hábitat es el suelo.
- Los microorganismos utilizados presentaron diferentes porcentajes de remoción de arsénico, debido a que cada uno tiene metabolismo, ciclo de vida, pH, elementos nutricionales, condiciones ambientales únicos etc, que juegan un papel importante en la remoción del metal y adaptación de los microorganismos.
- *Pseudomona aeuroginosa* a pesar de tener un metabolismo eficiente en remoción de metales y otros contaminantes no presentó un valor esperado debido a que necesita mayores temperaturas para que su metabolismo y actividades fisiológicas se desarrollen normalmente.
- Los resultados de remoción de *Trichoderma harzianum* no fueron los esperados, esto se debe a que este género y especie a pesar de ser agresivos para disminuir contaminantes no se encontró en su medio ideal, ya que esta especie es saprófita de suelo y en este medio los niveles de remoción del metal son mayor.
- La técnica de biorremediación es una herramienta viable y una tecnología limpia para ayudar a remover el metal en la zona de Toacaso. La concentración inicial de As fue de 0.70 ppm y la remoción fue de 0.48 ppm, es un valor interesante a considerar tomado en cuenta que el agua corresponde a la fuente de los Ilinizas, y que supera los límites permisibles de 0.20 ppm manifestado por el TULAS, demostrándose que el uso de los microorganismos a través de su metabolismo disminuye el metal en el agua.

## Recomendaciones

- Implementar el proceso de Biorremediación de As a gran escala a través de la aplicación de biomasa de *P. ostreatus* en la planta de tratamiento de agua y en el reservorio de la comunidad de Toacaso.
- Seleccionar microorganismos tanto de suelos como de aguas de diferentes puntos para caracterizar organismos viables que ayuden en la biorremediación y así optimizar el proceso.
- Emplear la especie de *Trichoderma rifai* la cual presenta mejor adaptación en agua en comparación a otras especies del mismo género para obtener un mejor resultado en el proceso de Biorremediación de As en agua con este hongo.
- Generar una etapa previa de adaptación de los microorganismos para potenciar su capacidad biorremediadora a través diferentes periodos de tiempo.
- Medir la eficiencia de *Pseudomonas aeruginosa* en diferentes temperaturas de agua para lograr su adaptación y medir realmente las concentraciones de As que puede remover.

## Bibliografía

- Acosta, L., Villegas, E., & Téllez, M. (2016). Characterization of five species of *Pleurotus* grown in four culture media. *Mexican Journal of Biotechnology*, *1(1)*(April), 1–11. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/312686569%0ACharacterization>
- Airam, E., Montoya, R., Montañez Hernández, L. E., Luévanos Escareño, M. P., & Balagurusamy, N. (2015). Impact of Arsenic on the Environment and its Microbial Transformation. *Terra Latinoamericana*, *33*, 103–118. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57339210001%0ACómo>
- Albores, A. Quintanilla, B. Del Razo, M. Cebrián, M. (2015). *Arsénico*. México D.F.
- Alguacil, J., & Merino, Y. (1998). Biotratamiento de contaminantes de origen. *Revista de Metalurgia*, *34* (5), 9. <https://doi.org/10.3989/revmetalm.1998.v34.i5.810>
- ALI, A., GUO, D., MAHAR, A., WANG, P., SHEN, F., LI, R., & ZHANG, Z. (2017). Mycoremediation of Potentially Toxic Trace Elements a Biological Tool for Soil Cleanup: A Review. *Pedosphere*, *27*(2), 205–222. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(17\)60311-4](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(17)60311-4)
- Apablaza, H., Farías, C., Cárcamo & Camiña, D. E. (2017). TRANSFER OF ARSENIC IN THE WATER-SOIL-MAIZE SYSTEM OF *Zea mays* L . OF CULTIVATED IN THE QUEBRADA DE CAMI-. *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, *83*(1), 52–64. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=371951877006%0ACómo>
- APHA. (2012) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22h edition,- AMERICAN PUBLICS HEALTH ASSOCIATION. “APHA”

- Arana, I., Orruño, M., & Barcina, I. (2010). COMO ABORDAR Y RESOLVER ASPECTOS PRÁCTICOS DE MICROBIOLOGÍA. (Vol. 1).
- Argumedo-Delira, R., Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R., & Peña-Cabriales, J. J. (2009). Revisión / Review EL GÉNERO FÚNGICO. *Rev. Int. Contam. Ambient*, 25(4), 257–269.
- Arora, S., Singh, A. K., & Singh, Y. P. (2017). Bioremediation of salt affected soils: An Indian perspective. *Bioremediation of Salt Affected Soils: An Indian Perspective*, 1–313. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-48257-6>
- Ávila Cubillos, C., Goretti Ramírez, M., & Lizcano Toledo, R. (2014). Aislamiento de *Trichoderma sp.* en las unidades productivas agrícolas del centro de formación agroindustrial La Angostura de Campoalegre (Huila). *Sena*, 15–20.
- Aznar, A. (2011). DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE CALIDAD DE LAS AGUAS. *Gestión Ambiental*, 2(23), 12–19.
- Bastidas, O. (2011). Conteo Celular con Hematocitómetro. *Technical Note-Neubauer Chamber Cell Counting*, 1–6.
- Bonilla, J. C. (2017). EFECTO ANTIFÚNGICO DEL CINAMALDEHIDO SOBRE CEPAS DE *CANDIDA ALBICANS*. ESTUDIO IN VITRO. Universidad Central del Ecuador. Retrieved from <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/12718/1/T-UCE-0015-753.pdf>
- Borrero, C. A., & H, M. R. S. (2005). Efectos de *Trichoderma* (in vitro) en los microorganismos no patógenos descomponedores de la materia orgánica de un suelo oxisol clase IV del piedemonte llanero. *Orinoquia*, 9(2), 6–14.

<https://doi.org/10.22579/20112629.133>

Brooks, G., Carroll, K., Butel, J., Morse, S., & Mietzner, T. (2014). *Microbiología médica*. (S. A. McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, Ed.) (25a ed.).

Bundschuh, J., Pérez, A., & Litter, M. (2009). Distribución del arsénico en las regiones Ibérica e Iberoamericana. *CYTED* (Vol. 59). Argentina. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

Cañedo, V., & Ames, T. (2004). Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. *Cip*. <https://doi.org/cip@cgiar.org>, [www.cipotato.org](http://www.cipotato.org)

Castellanos; Rache. (2013). DEGRADACIÓN DE PLAGUICIDAS N-METILCARBAMATOS 1 Laboratorio de Microbiología, Departamento de Biología y Microbiología, Universidad de Boyacá, Campus Universitario Tunja-Colombia: Carrera 2ª Este No. 64-169 Laboratorio de Biología molecular, Departam, 29, 105–119.

Castelo Granizo, M. (2015). Determinación de Arsénico y Mercurio en agua de consumo del cantón Rumiñahui por Espectrofotometría de Absorción Atómica. PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR. Retrieved from [http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/8658/Determinación de Arsénico y Mercurio en agua de consumo del Cantón Rumiñahui.pdf?sequence=1](http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/8658/Determinación%20de%20Arsénico%20y%20Mercurio%20en%20agua%20de%20consumo%20del%20Cantón%20Rumiñahui.pdf?sequence=1)

Castillo. (2005). *Biotechnología Ambiental* (p. 35–62.). Madrid - España.

Castrejón, Sánchez, E., & Ortiz, M. (2004). Caracterización e identificación de consorcios bacterianos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*.

Castro, Á., & Rivillas, C. (2012). *Trichoderma spp.* Modos de acción, eficacia y uso

en el cultivo de café. *Cenicafé*, (0120–047 X), 31.  
<https://doi.org/10.1267/THRO04050991>

Chavez, M. (2006). Producción de *Trichoderma sp.* y evaluación de su efecto en cultivo en crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Pontificia Universidad Javeriana.

Coello Paredes, J. M. (2011). Aplicación del hongo *Pleurotus ostreatus* como alternativa para la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados. *Espol*, 49.

Collantes, T., & Castillo, R. (2015). Biorremediación de cromo VI de aguas residuales de curtiembres por *Pseudomonas sp* y su efecto sobre el ciclo. <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/rmv/v04n1/pdf/a04v4n1.pdf>

Cullen, W. R. (2014). Chemical mechanism of arsenic biomethylation. *Chemical Research in Toxicology*, 27(4), 457–461. <https://doi.org/10.1021/tx400441h>

Cumbal, L., Duchicela, J., & Navas, S. (2015). Evaluación de la tolerancia a arsénico de las esporas de cuatro especies de hongos arbusculares.

Delgado, M., & Mariano, L. (2011). El arsénico, ese conocido tan desconocido, *15*(April 2012), 40–55.

Deshmukh, R., Khardenavis, A. A., & Purohit, H. J. (2016). Diverse Metabolic Capacities of Fungi for Bioremediation. *Indian Journal of Microbiology*, 56(3), 247–264. <https://doi.org/10.1007/s12088-016-0584-6>

Dhankhar, R., & Hooda, A. (2011). Fungal biosorption – an alternative to meet the challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions, *3330*(May). <https://doi.org/10.1080/09593330.2011.572922>

- Doroteo, L. A. (2007). Producción de inóculo líquido para el cultivo de *Pleurotus* spp., 78.
- Duque Sarango, A., & Díaz, Y. (2016). Evaluación de la degradación de arsénico con cepas bacterianas aisladas de relaves mineros, en el Cantón Ponce Enríquez. *Facultad de Ciencias, Bachelor*, 99.
- Durairaj, S. (2017). Bioremediation studies on reduction of heavy metals toxicity TOXICITY, (January 2014).
- Adevayo, E & D, M.-C. (2015). Oyster mushrooms (*Pleurotus*) are useful for utilizing lignocellulosic biomass. *African Journal of Biotechnology*, 14(1), 52–67. <https://doi.org/10.5897/AJB2014.14249>
- Eduardo, O., Rey, L., Rubio, J. D., Andrei, C., & Zambrano, C. (2016). Evaluación de dos hongos filamentosos métodos patógenos de conservación de. *Centro Agrícola*, 43(2), 36–41.
- Elias, M. Wellner A. Goldin, K. Chabriere, E. Vorholt, J. Erb, T. Tawfik, D. (2012). *The molecular basis of phosphate discrimination in arsenate-rich environments*.
- Fernández, S., & Pértega, S. (2001). Estadística descriptiva de los datos. *Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística*, 1–5. Retrieved from <https://www.fisterra.com/mbe/investiga/10descriptiva/10descriptiva.asp>
- Freddy Ruben, B. T., & Andres Dario, B. L. (2017).“Comparación de la efectividad del hongo *Pleurotus ostreatus* y *Trichoderma harzianum* en la disminución de concentración de metales pesados en lodos de lixiviación de un relleno sanitario.” Retrieved from <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/6307/1/236T0250.pdf>



- Gadd, G. M. (2007). Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological Research*, *111*(1), 3–49. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.12.001>
- Gamazo. (2005). Manual práctico de Microbiología. In MAZÓN (Ed.) (3rd ed., pp. 38–40). Barcelona.
- Garzón, J. M., Rodríguez Miranda, J. P., & Hernández Gómez, C. (2017). Aporte de la biorremediación para solucionar problemas de contaminación y su relación con el desarrollo sostenible. *Universidad y Salud*, *19*(2), 309. <https://doi.org/10.22267/rus.171902.93>
- INEN. (2013). NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 2169 - AGUA. CALIDAD DEL AGUA. MUESTREO. MANEJO Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS. Retrieved from [http://sut.trabajo.gob.ec/publico/Normativa Técnica INEN/NTE INEN 2169 - AGUA. CALIDAD DEL AGUA. MUESTREO. MANEJO Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS.pdf](http://sut.trabajo.gob.ec/publico/Normativa_Técnica_INEN/NTE_INEN_2169_-_AGUA._CALIDAD_DEL_AGUA._MUESTREO._MANEJO_Y_CONSERVACIÓN_DE_MUESTRAS.pdf)
- Jangir, M., Pathak, R., & Sharma, S. (2017). *Trichoderma* and Its Potential Applications. *Plant-Microbe Interactions in Agro-Ecological*.
- Jaramillo, C., & Patiño, P. (2014). Sistema de biosorción de metales pesados de los lixiviados del relleno sanitario la esmeralda de la ciudad de Manizales. *UNIVERSIDAD DE MANIZALES*.
- Jawetz, Melnick, & Adelberg. (2010). Microbiología médica. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Kapahi, M., & Sachdeva, S. (2017). Mycoremediation potential of *Pleurotus* species

- for heavy metals: a review. *Bioresources and Bioprocessing*, 4(1).  
<https://doi.org/10.1186/s40643-017-0162-8>
- Kapoor, A., & Viraraghavan, T. (1995). Fungal biosorption - an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters, 8524(95), 195–206.  
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0960-8524\(95\)00072-M](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0960-8524(95)00072-M)
- Laursen, A. (2018). The Effect of Different Nitrogen Sources on Mycelial Growth of Oyster Mushroom , *Pleurotus ostreatus*. *Swedish University of Agricultural Science*.
- López-Jácome, L., Hernández, M., Colín- Castro, A., Ortega, S., Cerón, G., & Franco, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación En Discapacidades*, 3(1), 10–18. Retrieved from <http://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2014/ir141b.pdf>
- Loynaz, I. A. (2014). Desarrollo de una tecnología para la producción a pequeña escala de la biomasa del hongo ostra *Pleurotus ostreatus*. Universidad de Camagüey “Ignacio Agramonte Loynaz.”
- MAG. (2017). Proyecto de implementación de riego parcelario tecnificado para el sistema de riego “Toacaso”, parroquia Toacaso, cantón Latacunga, provincia de Cotopaxi.
- Manahan. (2007). *Química Ambiental. Introducción a la química ambiental*.
- Marín, R. (2003). Físicoquímica y microbiología de los medios acuáticos tratamiento y control de calidad de aguas. (S. A. Diaz de Santos, Ed.) (Primera). Madrid - España.
- Martín, I. (2004). Riesgo sanitario por presencia *Pseudomonas aeruginosa*.

- Martínez, B., Infante, D., & Reyes Ii, Y. (2013). *Trichoderma spp.* y su función en el control de plagas en los cultivos. *Rev. Protección Veg*, 28(1), 1–11.
- Medaura, M., et al. (2013). Micorremediación y su aplicación para el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos pesados, 1–10.
- Montero, M. M. (2012). *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente: aspectos epidemiológicos, clínicos y terapéuticos, 109.
- Navoni, J. A., De Pietri, D., Garcia, S., & Villaamil Lepori, E. C. (2012). Health risk for the vulnerable population exposed to arsenic in the province of Buenos Aires, Argentina. *Revista Panamericana De Salud Publica-Pan American Journal of Public Health*, 31(1), 1–8.
- Paredes, M. (2017). Evaluación de la biodegradación de un insecticida carbamato en muestra de suelo de cultivo de papa, mediante *Trichoderma harzianum* y *Pleurotus ostreatus*. Universidad Politécnica Salesiana.
- Pellizzari, E. E., Marinich, L. G., Flores, S. A., & Giménez, C. M. (2015). Arsenic degradation by *Pseudomonas aeruginosa* for water bioremediation. Preliminary study, 6(1), 1–5. Retrieved from [http://www.exeedu.com/publishing.cl/av\\_cienc\\_ing/](http://www.exeedu.com/publishing.cl/av_cienc_ing/)
- Pellizzari, E., Marinich, L., Flores, S., & Giménez, C. (2015). Arsenic degradation by *Pseudomonas aeruginosa* for water. *Avances En Ciencias e Ingeniería*, 6(1), 1–5. Retrieved from <https://doaj.org/article/4f1b52605d16471d8ec66e76504efd5a>
- Perez, B. (2006). Descripción de las características macroscópicas, de cultivo in vitro de cepas de *Pleurotus* aisladas en Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. Retrieved from [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06\\_2457.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2457.pdf)

- Pincha Gualberto, L., Rubio, B. J., Toaquiza, E., Olmedo, I., Gina, D., & Iza, Y. (2014). Parte I DIAGNOSTICO DE LA PARROQUIA TOACASO. *Gobierno Autónomo Descentralizado Parroquial Rural De Toacaso*. Retrieved from [http://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PORTAL\\_SNI/data\\_sigad\\_plus/sigadplusdiagnostico/0560018320001\\_DIAGNOSTICO\\_FINAL\\_DE\\_LA\\_PARROQUIA\\_TOACASO\\_2015\\_-\\_2016\\_30-10-2015\\_18-57-10.pdf](http://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PORTAL_SNI/data_sigad_plus/sigadplusdiagnostico/0560018320001_DIAGNOSTICO_FINAL_DE_LA_PARROQUIA_TOACASO_2015_-_2016_30-10-2015_18-57-10.pdf)
- Poalacin, J. (2015). Estudio del adecuado crecimiento del hongo *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma hamatum* en sustrato sólido. UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR.
- Rangel Montoya, E. A., Montañez Hernández, L. E., Luévanos Escareño, M. P., & Balagurusamy, N. (2015). Impact of Arsenic on the Environment and its Microbial Transformation. *Terra Latinoamericana*, 33, 102–118.
- Reyes, Y. C., Vergara, I., Torres, O. E., Díaz, M., & González, E. E. (2016). Contaminación por metales pesados: implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria. *Revista Ingeniería, Investigación y Desarrollo*, 16(2), 66–77. <https://doi.org/10.19053/1900771X.v16.n2.2016.5447>
- Rhodes, C. J. (2015). Mycoremediation ( bioremediation with fungi ) – growing mushrooms to clean the earth, 2299. <https://doi.org/10.3184/095422914X14047407349335>
- Rocha, J. (2005). Producción de 6-pentil-(alfa)-pirona *Trichoderma harzianum*: efecto de las condiciones hidrodinámicas sobre la fisiología de un cultivo miceliar. *Universidad Nacional Autónoma de México*.
- Rodríguez, G. (2013). Estudio proteómico y de resistencia a arsénico y mercurio en la

bacteria cianotrofa *Pseudomonas*. *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular*.

Rodríguez Martínez, H. L., Peña Manjarrez, M., Reyes Gutiérrez, V. A., Trevizo González, L. C., Montes Fonseca, L. S., & López Avalos, G. G. (2017). Biorremediación de arsénico mediada por microorganismos genéticamente modificados Arsenic bioremediation mediated by genetically modified microorganisms Cita recomendada. *Terra Latinoamericana*, 35, 353–361. Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/tl/v35n4/2395-8030-tl-35-04-00353.pdf>

Ruiz. (2007). “*Pseudomonas Aeruginosa*: “Aportación al conocimiento de su estructura y mecanismos de resistencia.”[https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2521/LRM\\_TESIS.pdf](https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/2521/LRM_TESIS.pdf);sequence=1.

Salgado, I., Durán, C., Cruz, M., Carballo, M., & Martínez, A. (2012). Bacterias rizosféricas con potencialidades fisiológicas para eliminar materia orgánica de aguas residuales, 28(1), 17–26.

Sánchez, C. (2013). Evaluación de la productividad del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* sobre un residuo agroindustrial del departamento del valle del Cauca y residuos de poda de la Universidad Autónoma de Occidente. (Trabajo de pregrado), 94.

Santaella. (2008). Análisis genómico, transcripcional y de flujo del metabolismo de la glucosa en *Pseudomonas putida*.

Santambrosio, E., Ortega, M., & Garibaldi, P. (2009). Tinción y observación de

microorganismos, 9. <https://doi.org/10.1093/qje/qjx015>. Advance

Senior, Cornejo-Rodríguez, Tobar, R.-M. y M. (2016). Metales pesados (cadmio, plomo, mercurio) y arsénico en pescados congelados. *Zootecnia Trop.*, 34 (2)(April), 143–153.

Shakoor, M. B., Niazi, N. K., Bibi, I., Murtaza, G., Kunhikrishnan, A., Seshadri, B., ... Ali, F. (2016). Remediation of arsenic-contaminated water using agricultural wastes as biosorbents. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 46(5), 467–499. <https://doi.org/10.1080/10643389.2015.1109910>

Siddiquee, S., Rovina, K., Azad, S. Al, Naher, L., Suryani, S., & Chaikaew, P. (2015). Heavy Metal Contaminants Removal from Wastewater Using the Potential Filamentous Fungi Biomass: A Review. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 07(06), 384–393. <https://doi.org/10.4172/1948-5948.1000243>

Simeonova, D. D. (2004). Arsenic oxidation of *Cenibacterium arsenoxidans* : Potential application in bioremediation of arsenic contaminated water, 155pp.

Singh, A. L., Singh, V. K., & Srivastava, A. (2013). Effect of Arsenic contaminated drinking water on human chromosome: A case study. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 28(4), 422–425. <https://doi.org/10.1007/s12291-013-0330-3>

Singh, R., Singh, S., Parihar, P., Singh, V. P., & Prasad, S. M. (2015). Arsenic contamination, consequences and remediation techniques: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 112, 247–270. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.10.009>

Soberón, G. (2015). *Pseudomonas aeruginosa*. In *Pseudomonas aeruginosa, Microbios* (p. Cap. 3). México: Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional

Autónoma de México.

Srivastava, P. K., Vaish, A., Dwivedi, S., Chakrabarty, D., Singh, N., & Tripathi, R.

D. (2011). Biological removal of arsenic pollution by soil fungi. *Science of the Total Environment*, 409(12), 2430–2442.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.03.002>

Tripathi, P., Singh, P. C., Mishra, A., Chauhan, P. S., Dwivedi, S., Bais, R. T., &

Tripathi, R. D. (2013). Trichoderma: A potential bioremediator for environmental clean up. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 15(4), 541–550.

<https://doi.org/10.1007/s10098-012-0553-7>

TULAS. (2011). Norma de Calidad Ambiental y de descarga de efluentes : Recurso Agua.

Varela, G. (2008). Fisiología y metabolismo bacteriano.

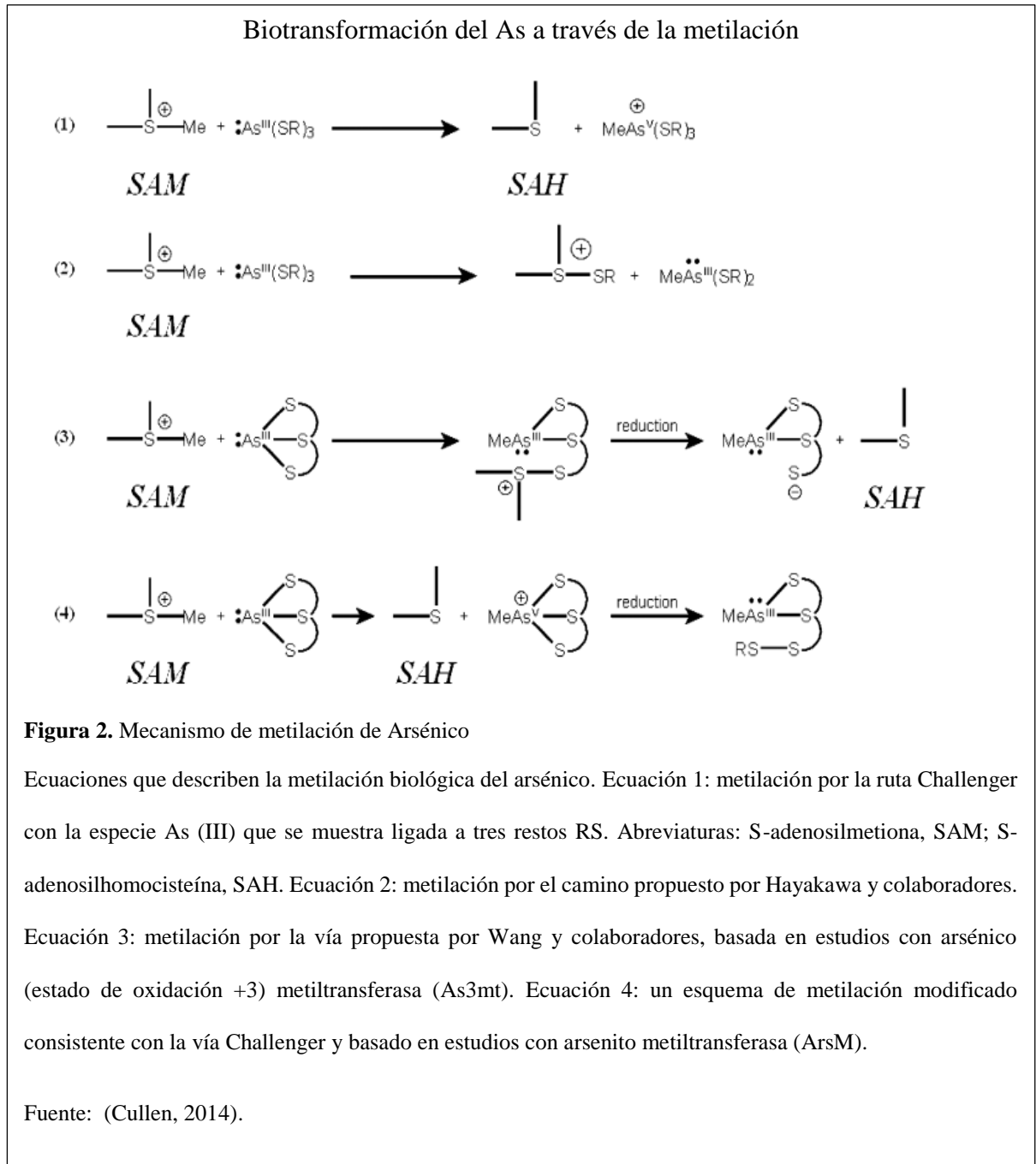
Watanabe, T. (2002). Soil and Seed Fungi Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species *Second Edition*. <https://doi.org/10.1108/09504121111134098>

Weitzman, M. (2015). Isolation and characterization of a native fungi from contaminated ecosystems for the bioremediation of arsenic. *UNIVERSITY OF WISCONSIN LA CROSSE*. <https://doi.org/10.1038/srep09835>

## Anexos

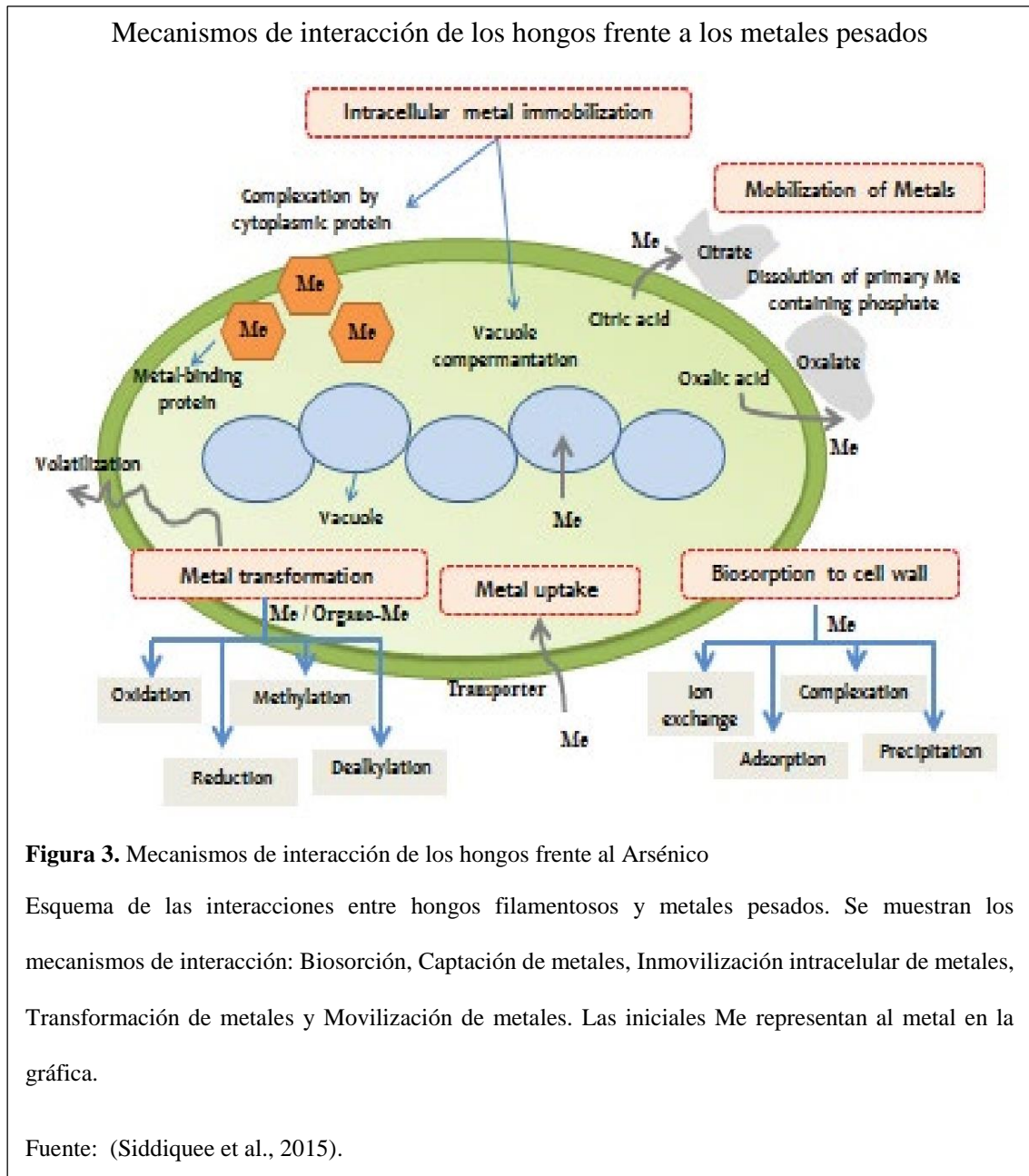
### Anexo 1. Metabolismos de microorganismos frente a arsénico

#### 1.A. Biotransformación del As a través de la metilación

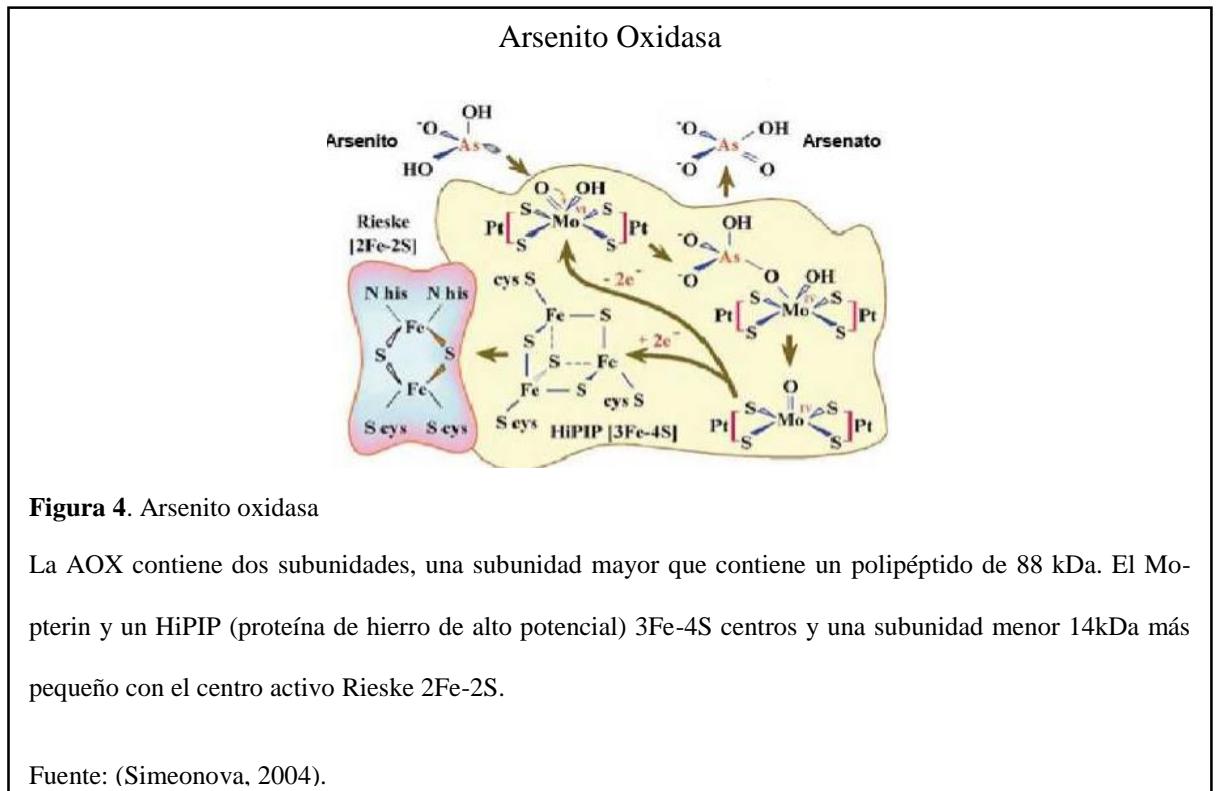




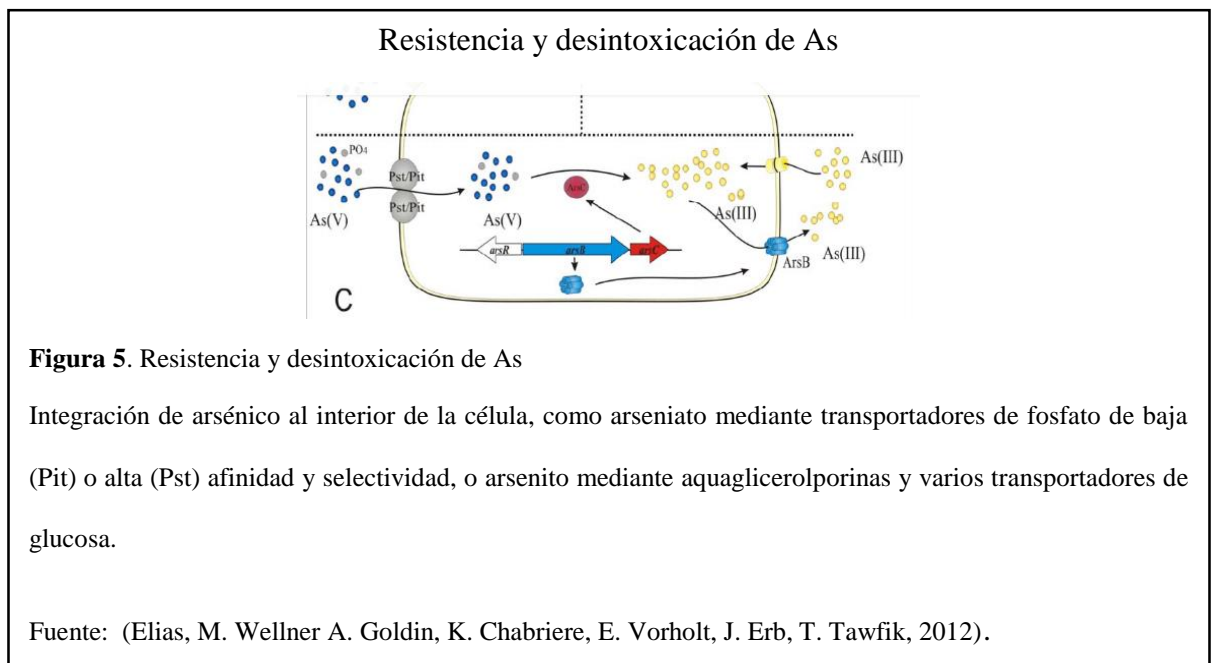
## 1.B. Mecanismos de interacción de los hongos frente a los metales pesados



### 1.C. Arsenito Oxidasa



### 1.D. Resistencia y desintoxicación de As



**Anexo 2.** Coordenadas UTM de la zona de muestreo en Toacaso

<b>PUNTOS</b>	<b>POINT_X</b>	<b>POINT_Y</b>
1	755198.00	9917005.00
2	755698.00	9916791.00
3	75585700	9916652.00
4	756490.00	9916236.00
5	757062.68	9916118.82
6	756776.85	9916185.51
7	757134.00	9915342.00
8	757716.00	9914572.00
9	757769.00	9915557.00
10	758818.00	9914572.00
11	758651.00	9915654.00
12	758786.37	9914321.17
13	758818.00	9914356.00
14	757304.00	9915122.00
15	757712.00	9914058.00
16	757518.00	9915723.00

Nota: Elaborado por: (Las autoras, 2018).

### Anexo 3. Parámetros analizados y sus metodologías

#### 3.A. Parámetros analizados

Parámetro	Unidad	Método de Valoración
Nitratos	mg/L	SM.4500 (NO <sub>3</sub> ) C
Amonio	mg/L	SM. 4500 (NH <sub>4</sub> ) C
Fosfatos	mg/L	SM. 4500 (P) E
Potasio	mg/L	SM 3111-B
Cloruros	mg/L	SM. 4500 (Cl) B
Relación absorción de Sodio	meq/L	SM 3111-B CÁLCULO
Sólidos Totales	mg/L	SM. 2540 A y 2540 D
Oxígeno Disuelto	mg/L	SM 4500-O-C
DBO	mg/L	SM. 5210 B
DQO	mg/L	SM. 5220 D
Conductividad eléctrica	mS/cm	ELECTRÓNICO MYRON
Turbidez	UNF	SM 2130: B
Color	PCU	SM 2120: B
Sulfatos	mg/L(SO <sub>4</sub> )	SM 4500-SO <sub>4</sub> : E
Dureza total	mg/L(CaCO <sub>3</sub> )	SM 3111-B
Calco	mg/L (Ca)	
Magnesio	mg/L (Mg)	
Sodio	mg/L (Na)	
Hierro	mg/L (Fe)	
Cobre	mg/L (Cu)	
Manganeso	mg/L (Mn)	
Zinc	mg/L (Zn)	
Boro	mg/L (B)	
Coliformes totales	UFC/ 100 mL	
Coliformes fecales	UFC/ 100 mL	

Nota: SM: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22h edition, 2012-

AMERICAN PUBLICS HEALTH ASSOCIATION. “APHA”

Elaborado por: (Las autoras, 2019).

### 3.B. Metodologías APHA

#### **Turbidez**

Pretratamiento de la muestra: (1) Eliminación de interferencias Burbujas de aire: Las burbujas influyen en la determinación de la turbidez y deben ser eliminadas si se encuentran en la muestra o adheridas a un lado de la celda, estas pueden ser removidas por varios métodos; uno de ellos es la aplicación de vacío. Este método es ideal porque no altera los sólidos de la muestra; brevemente sumerja el final de la celda con la muestra en un baño ultrasónico, con lo cual se purga la muestra de burbujas. Partículas grandes: Las partículas grandes en la muestra pueden causar incrementos en las lecturas de la turbidez, por lo tanto, se deben eliminar antes de la determinación. (2) Medida de la Turbidez de la muestra Las condiciones de la celda para la muestra son muy importantes, las huellas pueden interferir en la determinación especialmente si se va medir una turbidez baja. Limpie la celda evitando usar algodón. Calibre el equipo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Enjuague la celda varias veces con la solución a analizar, llene la celda con aproximadamente 25 mL de la muestra y seque con un paño libre de algodón, elimine las burbujas de aire de la celda, coloque la celda en el equipo y lea directamente la turbidez. (3) Análisis de muestras con turbidez superior a 1.000 Diluya la muestra con agua libre de turbidez. Determine la turbidez de la muestra diluida

Cálculo: Para la muestra sin diluir en Turbidez en UNT = Lectura en el equipo y muestras diluidas:

$$\text{Turbidez}_{\text{UNT}} = \frac{A \times (B - C)}{C}$$

A: UNT encontradas en la muestra diluida; B: Volumen en mL del agua de dilución  
C: Volumen de muestra tomada para la dilución

#### **Color**

Procedimiento: (1) Prepare la curva patrón, mida la absorbancia de las soluciones estándar a 456 nm en un espectrofotómetro y haga la curva de absorbancia contra concentración (U. Pt-Co). (2) Análisis de la muestra Color Aparente: Lea la absorbancia de la muestra a 456 nm sin ningún tratamiento previo, en un espectrofotómetro y determine el color en la curva patrón. Si el color excede la concentración de la curva patrón, diluya la muestra con agua destilada, tomando una alícuota y aforando a 50 mL. Determine la absorbancia de la muestra diluida. Mida el pH. (3) Color Real: Por medio de una centrifuga separe la turbidez presente en la muestra. El tiempo requerido de centrifugación depende de la naturaleza de la muestra y la velocidad de centrifugación. Compare la muestra centrifugada con agua destilada para asegurarse que la turbiedad ha sido removida. Lea la absorbancia de la muestra tratada en el espectrofotómetro y determine el color de la misma manera que se determina el color aparente.

Cálculo: En muestras sin diluir la concentración se lee directamente en la curva patrón. Cuando se ha diluido la muestra hasta un volumen de 50 mL:

$$\text{Unidades de color (U. Pt - Co)} = \frac{A \times 50}{B}$$

A: Unidades de color determinado en la curva patrón en la muestra diluida; B: mL de muestra para la dilución

### **Conductividad Eléctrica**

Procedimiento:

Análisis de la muestra: Enjuague la celda con la solución de KCl estándar y ajuste equipo al valor de 1412 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Enjuague la celda con varias porciones de la muestra, pase la muestra a un beaker, ajuste la temperatura de la muestra a 25°C e introduzca la celda en la muestra. Tome la lectura directamente del equipo.

### **Dureza**

Procedimiento: Pretratamiento de las muestras de aguas contaminadas y residuales: Se sigue el procedimiento indicado en la eliminación de interferencias.

Titulación de la muestra para muestras con dureza alta: (1) Tome una alícuota (que requiera menos de 15 mL de EDTA en la titulación). (2) Diluya hasta 50 mL con agua destilada. (3) Adicione 1-2 mL de solución tampón (hasta pH aproximado de 10). (4) Adicione 2 gotas de indicador. (5) Titule con EDTA hasta cambio de color, de rojo vinoso a azul. (6) Realice la titulación cinco minutos después de la adición de la solución tampón. (7) Realice un blanco con agua destilada. En caso de no presentarse el cambio de color, es necesario adicionar un inhibidor.

Titulación de la muestra para muestras con dureza baja: (1) Tome 100 mL de muestra, (2) Adicione cantidades proporcionales de tampón, inhibidor e indicador, (3) Titule con la solución de EDTA, (4) Realice un blanco con agua destilada

Cálculo:

$$\text{DUREZA}_{\left(\frac{\text{mg CaCO}_3}{\text{l}}\right)} = \frac{(A - B) \times M \times 100.000}{\text{ml}_{\text{muestra}}}$$

A: Volumen de EDTA utilizados en la titulación de la muestra; B: Volumen de EDTA para la titulación del blanco, M: Molaridad de la solución de EDTA.

Cuando se reemplaza el negro de eriocromo-T por tabletas tampón indicadoras, se reemplaza la solución buffer por solución de hidróxido de amonio (1 mL generalmente es suficiente) y el cambio de color es de rojo vinoso a un verde.

### **Determinación de Sulfatos**

Procedimiento:

Preparación de la curva de la calibración: (1) Mida con pipeta volumétrica 100 mL de cada uno de los patrones, páselos a un Erlenmeyer de 250 mL, (2) Adicione 20 ml de la solución tampón (A o B, de acuerdo con la concentración) a cada uno de los patrones, (3) Agite en un agitador magnético, (4) Mientras agita, adicione 0.2 o 0.3 g de cloruro de bario ( $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) en cristales, (5) Continúe agitando durante  $60 \pm 2$  s contados a partir de la adición del  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a velocidad constante, (6) Mida la absorbancia de la solución a 420 nm, (7) Trace una curva de Absorbancia Vs. concentración.

Tratamiento de la muestra: (1) Mida 100 mL de muestra y trátelos de igual forma que los patrones. (2) Realice un blanco para corrección por color y turbidez, sin adicionar el BaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O

Cálculos: Determine la concentración de la muestra en la curva patrón. Si hizo dilución, multiplique la lectura por el factor de dilución.

### **Determinación metales**

Procedimiento: Tratamiento Preliminar, las muestras que contienen materia orgánica requieren en general, un tratamiento previo antes del análisis. Los metales totales incluyen todos los metales combinados orgánica o inorgánicamente, tanto disueltos como en partículas. Las muestras incoloras, inodoras y con una turbidez menor a 1 UNT, se analizan directamente, y no requieren digestión previa. Para todas las otras muestras se requiere una digestión preliminar. Si va a analizar metales disueltos, debe filtrar la muestra, acidular el filtrado y en el determinar los metales disueltos. Para analizar los metales suspendidos, filtre la muestra y haga digestión del filtro y del residuo. Filtración preliminar Para analizar metales disueltos o suspendidos, filtre la muestra en el momento de la recolección, utilice un filtro de membrana 0.45 micras previamente lavado con 50 mL de agua desionizada. Para los metales disueltos, después de la filtración acidule el filtrado a pH 2 con ácido nítrico y determine los metales en el filtrado. Digestión de la muestra para análisis de cationes Para analizar metales totales, es necesaria la digestión de la muestra sin filtración. La digestión se realiza para reducir interferencias de la materia orgánica. El ácido nítrico puede utilizarse para la mayoría de las muestras. En casos donde se presente materia orgánica de difícil oxidación, debe realizar una digestión con ácido Nítrico y ácido perclórico. Cuando la cantidad de materia orgánica es muy grande haga una combustión seca de la muestra. El volumen de la muestra para el análisis depende de la concentración esperada del metal.

### **Determinación de la demanda biológica de oxígeno (DBO)**

Procedimiento: Preparación del agua de dilución, (1) Calcule el volumen de agua necesario, (2) Adicione 1 mL. por cada litro de la solución de sulfato de magnesio, (3) Adicione 1 mL. por cada litro de la solución de cloruro calcio, (4) Adicione 1 mL. por cada litro de la solución de cloruro férrico, (5) Adicione 1 mL. por cada litro de la solución amortiguadora de fosfato (6) Si es necesario inocular el agua de dilución, utilice simientes como se especifica más adelante, (7) Antes de usar el agua de dilución, debe saturarla con oxígeno disuelto agitando en una botella parcialmente llena o aireando con aire filtrado libre de materia orgánica.

Cálculos:

$$DBO_{\left(\frac{mg}{l}\right)} = \frac{(D_1 - D_2)}{P}$$

D1: OD inicial de la muestra diluida en mg/L; D2: OD final de la muestra diluida en mg/L; P: Fracción decimal de muestra usada

### **Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO)**

Procedimiento: (1) Tome con pipeta volumétrica 50 mL. de muestra, (si el DQO es mayor de 900, tome una alícuota menor y complete hasta 50 con agua destilada) en un balón de reflujo de 500 mL. (2) Añada 1 g. de HgSO<sub>4</sub>. (3) Agregue muy lentamente 5

mL. de ácido sulfúrico concentrado para disolver el sulfato de mercurio enfríe la mezcla para evitar posibles pérdidas el material volátil. (4) Añada 25 mL. de la solución de dicromato de potasio 0.25 N y mezcle; haciendo girar el matraz en un chorro de agua fría. (5) Adicione cuidadosamente 70 ml. del reactivo de ácido sulfúrico, mezcle cuidadosamente. (6) Conecte el matraz al condensador y deje en reflujo durante 2 horas. (7) Enfríe y lave el condensador con agua destilada. (8) Desconecte el condensador de reflujo y diluya la mezcla hasta aproximadamente el doble de su volumen. (9) Enfríe a temperatura ambiente 10. Adicione 2 - 3 gotas de ferroina como indicador. (10) Titule el exceso de dicromato con solución FAS. (11) El punto final se da con el cambio de color del azul verdoso al marrón.

Cálculos:

$$DQO_{(mg/l)} = \frac{(A - B) \times N \times 8.000}{V \text{ ln muestra}}$$

A: Volumen de FAS gastados en la titulación del blanco; B: Volumen de FAS gastados en la titulación de la muestra; N: Normalidad del FAS.

### **Determinación de nitratos**

Procedimiento:

Preparación del Electrodo: (1) Atornille el elemento sensor en la cabeza del electrodo y ajuste ligeramente. (2) Sacuda varias veces, con el objeto de asegurar el contacto. (3) Sumerja el electrodo en agua destilada por 10 minutos. (4) Finalmente sumerja el electrodo en solución de KN03 0.01 M por más de 2 horas.

Análisis de la muestra: (1) Debido a que hay varios iones que pueden causar interferencia, es necesario el pretratamiento de las muestras: a. Si existen carbonatos o bicarbonatos remuévalos por adición de ácido sulfúrico 1N hasta un pH de 4.5; b. Para remover halógenos, cianuros y fosfatos adicione sulfato de plata (0.1 g. de Ag2S04 remueven aproximadamente 22 mg Cl); c. Si existen partículas en suspensión filtre la muestra. (2) Una vez eliminadas las interferencias, y después de haber realizado la calibración del método, determine la concentración de nitratos por lectura directa en el equipo.

Cálculos: Si desea expresar la concentración en mg de N-N03 multiplique la lectura obtenida en equipo por 0.2258.

### **Determinación de cloruros**

Procedimiento: (1) Preparación de la muestra: Sí la muestra es altamente coloreada, tome 100 mL, adicione 3 mL de la suspensión de hidróxido de aluminio; mezcle, deje en reposo y filtre. Si están presentes sulfuras, sulfitos o tiosulfatos, adicione un mL de peróxido de hidrógeno y agite durante un minuto. (2) Ajuste el pH entre 8 y 10 con NaOH o H2S04, según el caso. (3) Titulación: Adicione 1 mL de solución indicadora de cromato de potasio. (4) Titule con la solución de AgN03 hasta que la solución cambie de amarillo a pardo rojizo, debido a la formación del precipitado de Ag2Cr04. (5) Repita el procedimiento con un blanco de reactivos.

Cálculos:

$$Cl^- \left( \frac{mg}{l} \right) = \frac{(A - B) \times 35.5000}{ml \text{ de muestra}}$$



A: mi de AgNO<sub>3</sub> gastados para la titulación de la muestra; B: mi de AgNO<sub>3</sub> gastados para la titulación del blanco; N: Normalidad de la solución de AgNO<sub>3</sub>.

### **Sólidos Totales**

Procedimiento: (1) Calcine la cápsula vacía en la mufla a 550 °C durante 1 hora. (2) Enfríe en el desecador y pese. (3) Transfiera 100 mL de la muestra o el volumen adecuado a la cápsula pesada, elija un volumen de muestra que proporcione un residuo entre 2.5 y 200 mg. (4) Evapore en una placa de calentamiento. (5) Lleve la cápsula con la muestra evaporada a una estufa a 103-105°C durante 1 hora. (6) Enfríe la cápsula en el desecador y pese. (7) Repita la operación hasta peso constante

Cálculo:


$$\text{Sólidos totales (STT)}(\text{mg/l}) = \frac{(B - A) \times 1000}{\text{ml}_{\text{muestra}}}$$

### **Determinación de As por absorción atómica**


Procedimiento: se emplea un espectrómetro de absorción atómica (Thermo AA S4) con generador de hidruros (VP100). La atomización se realiza en una celda T de cuarzo y con llama de aire-acetileno a una longitud de onda de 193.7 nm, velocidad de flujo del gas Nitrógeno de 200 mL/min, ranura de 0.5 mm y altura de mechero de 15.0 mm. 300 µL de ácido sulfámico al 10% (p/v) se adicionan para disminuir el grado de interferencia en las muestras y patrones; la reducción se realiza con borohidruro de sodio al 0.5% (m/v) en hidróxido de sodio al 0.5% (m/v) y ácido clorhídrico al 10% v/v como matriz. La cuantificación de arsénico se realiza por el método de curva de calibración, usando un estándar puro comercial de arsénico (Merck), a partir del cual se prepararán 8 patrones en el rango de 2.0 a 20.0 µg/L en una solución de HCl al 1.0% (APHA, 2019)

## Anexo 4. Análisis inicial de los parámetros físico-químicos del agua

### 4.A. Análisis iniciales de los parámetros físico-químicos del agua



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**  
ECUADOR



**SALESIANOS DON BOSCO**  
ECUADOR

**LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA**

Pág. 1 de 1

**Cliente:** UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA  
**Dirección:** Av. Isabel La Católica N. 23-52 y Madrid  
**Contacto:** Ing. Agr. Laura Huachi Espín  
**Cantidad de muestras:** 1  
**Fecha de ingreso:** Junio 15, 2018  
**Característica de la Muestra:** Agua

**Tel/Cel.:** (593)2-3962-900  
**E-mail:** lhuachi@ups.edu.ec  
**N° de Informe:** 18205  
**Fecha Emisión:** Julio 03, 2018  
**Fecha de Análisis:** Junio 15 al 26, 2018

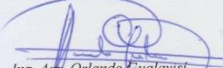
**INFORME DE RESULTADOS**

Identificación de Usuario	Unidad	BASE ILINIZA	MÉTODO DE VALORACIÓN
Código de laboratorio		LSA18-350	
Parámetros			
Temperatura	°C	11,00	ELECTRÓNICO HANNA
Potencial Hidrógeno	U pH	6,29	SM 4500-H+ A y 4500-H+ 8
Conductividad Eléctrica	mS/cm	0,49	ELECTRÓNICO MYRON
Turbidez	UNF	< 0,05	SM 2130: B
Color	PCU	< 0,05	SM 2120: B
Sulfatos	mg/L (SO <sub>4</sub> )	< 0,50	SM 4500-SO <sub>4</sub> : E
Dureza Total	mg/L (CaCO <sub>3</sub> )	159,65	
Calcio	mg/L (Ca)	35,96	
Magnesio	mg/L (Mg)	16,96	
Sodio	mg/L (Na)	64,80	SM 3111-B
Hierro	mg/L (Fe)	0,17	
Cobre	mg/L (Cu)	< 0,05	
Manganeso	mg/L (Mn)	0,01	
Zinc	mg/L (Zn)	0,04	
Boro	mg/L (B)	< 0,05	SM 4500-B: B
Coliformes Totales	ufc/100mL	< 1	SM 9222-D
Coliformes fecales	ufc/100mL	< 1	

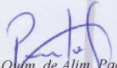
**DATOS ADICIONALES:**  
 U pH: unidades; mS/cm: miltsiemens por centímetro; PCU: unidades de color Platino; UNF: unidad nefelométrica de turbidez; mg/L: miligramos por litro; ufc/mL: unidades formadoras de colonias por mililitro de muestra; ufc/100mL: unidades formadoras de colonias en cien mililitros de muestra.

SM: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22th Edition, 2012 -AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION "APHA".

**Observaciones**  
 Los resultados corresponden únicamente a la(s) muestra(s) entregada(s) por el CLIENTE




Ing. Agr. Orlando Gualavisi  
Técnico de Suelos y Agua



Quím. de Alim. Paola Simbaña  
Responsable de Laboratorio

**LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA**

Cayambe, Av. Natalia Jarrín N3-85 y 9 de Octubre. Teléfonos: 593 (2) 3962946 / 3962800 ext. 2504-2534.  
 Correo electrónico: ogualavisi@ups.edu.ec / bioagrolab@ups.edu.ec



LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA

**Cliente:** UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA  
**Dirección:** Av. Isabel La Católica N. 23-52 y Madrid  
**Contacto:** Ing. Agr. Laura Huachi Espín  
**Cantidad de muestras:** 1  
**Fecha de de ingreso:** Junio 15, 2018  
**Característica de la Muestra:** Agua

**Telf/Cel.:** (593)2-3962-900  
**E-mail:** lhuachi@ups.edu.ec  
**N° de Informe:** 18206  
**Fecha Emisión:** Julio 03, 2018  
**Fecha de Análisis:** Junio 15 al 26, 2018

INFORME DE RESULTADOS

Identificación de Usuario Código de laboratorio Parámetros	Unidad	BASE ILINIZA	MÉTODO DE VALORACIÓN
		LSA18-350	
Nitratos	mg/L	1,46	SM. 4500 (NO3) C
Amonio	mg/L	< 1,00	SM. 4500 (NH4) C
Fosfatos	mg/L	0,32	SM. 4500 (P) E
Potasio	mg/L	8,00	SM 3111-B
Cloruros	mg/L	< 20,00	SM. 4500 (Cl) B
Arsénico*	ug/L	< 2,00	SM. 3114 B
Relación Absorción de Sodio	meq/L	2,22	SM 3111-B CÁLCULO
Sólidos Totales	mg/L	0,37	SM. 2540 A y 2540 D
Oxígeno Disuelto	mg/L	8,34	SM. 4500-O-C
Demanda Bioquímica de Oxígeno	mg/L	< 4,75	SM. 5210 B
Demanda Química de Oxígeno	mg/L	< 10,00	SM. 5220 D

**DATOS ADICIONALES:**


mg/L: miligramos por litro; ug/L: microgramos por litro; meq/L: miliequivalentes por litro.

(\* Los ensayos se realizaron al Laboratorio de Ensayo ALS acreditado por la SAE con Acreditación N° OAE LE 2C 05-005

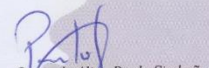
SM: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22th Edition, 2012 -AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. "APHA"

**Observaciones**

Los resultados corresponden únicamente a la(s) muestra(s) entregada(s) por el CLIENTE



Ing. Agr. Orlando Gaalavisi  
Técnico de Suelos y Agua



Quim. de Alim. Paola Simbaña  
Responsable de Laboratorio



LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA

Cayambe, Av. Natalia Jarrín N3-85 y 9 de Octubre. Teléfonos: 593 (2) 3962946 / 3962800 ext. 2504-2534.  
Correo electrónico: ogalavisi@ups.edu.ec / bioagrolab@ups.edu.ec

**LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA**

**Cliente:** UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

**Dirección:** Av. Isabel La Católica N. 23-52 y Madrid

**Contacto:** Ing. Agr. Laura Huachi Espin

**Cantidad de muestras:** 1

**Fecha de ingreso:** Junio 15, 2018

**Característica de la Muestra:** Agua

**Tel/Cel.:** (593)2-3962-900

**E-mail:** lhuachi@ups.edu.ec

**N° de Informe:** 18207

**Fecha Emisión:** Julio 03, 2018

**Fecha de Análisis:** Junio 15 al 26, 2018

**INFORME DE RESULTADOS**

Identificación de Usuario	Unidad	TOCASO ILINIZA VERTIENTE	MÉTODO DE VALORACIÓN
Código de laboratorio Parámetros		LSA18-346	
Arsénico*	ug/L	< 2,00	SM. 3114 B

**DATOS ADICIONALES:**


ug/L: microgramos por litro:

(\* Los ensayos se realizaron en el Laboratorio de Ensayo ALS acreditado por la SAE con Acreditación N° OAE LE 2C 05-005.

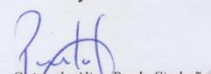
SM: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22th Edition, 2012 -AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. "APHA"

**Observaciones**

Los resultados corresponden únicamente a la(s) muestra(s) entregada(s) por el CLIENTE



Ing. Agr. Orlando Gualavisi  
Técnico de Suelos y Agua



Quím. de Anál. Paola Simbaña  
Responsable de Laboratorio



LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA

Cayambe, Av. Natalia Jarrín N3-85 y 9 de Octubre. Teléfonos: 593 (2) 3962946 / 3962800 ext. 2504-2534.  
Correo electrónico: ogualavisi@ups.edu.ec / bioagrolab@ups.edu.ec

LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA

Pág. 1 de 1

**Cliente:** UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

**Dirección:** Av. Isabel La Católica N. 23-52 y Madrid

**Contacto:** Ing. Agr. Laura Huachi Espín

**Tel/Cel.:** (593)2-3962-900

**E-mail:** lhuachi@ups.edu.ec

**Cantidad de muestras:** 3

**N° de Informe:** 18208

**Fecha de ingreso:** Junio 15, 2018

**Fecha Emisión:** Julio 03, 2018

**Característica de la Muestra:** Agua

**Fecha de Análisis:** Junio 15 al 26, 2018

INFORME DE RESULTADOS


Código Laboratorio	Identificación del Cliente	PARÁMETRO	MÉTODO DE VALORACIÓN
		Arsénico (mg/kg)	
LSA18-347	MUESTRA UNO ILINIZAS	439,82	SM. 3114 B
LSA18-348	MUESTRA DOS RÍOS	250,50	
LSA18-351	CULTIVO DE PAPA TOACASO	7,12	

DATOS ADICIONALES:

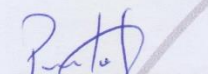
mg kg: miligramos por kilogramo.

(\*) Los ensayos se realizaron en el Laboratorio de Ensayo ALS acreditado por la SAE con Acreditación N° OAE LE 2C 05-005.

SM: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22th Edition, 2012 -AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. "APHA"



Ing. Agr. Orlando Gualavisi  
Técnico de Suelos y Agua




Quím. de Alim. Paola Simbaña  
Responsable de Laboratorio



LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA


Cayambe, Av. Natalia Jarrín N3-85 y 9 de Octubre. Teléfonos: 593 (2) 3962946 / 3962800 ext. 2504-2534.  
Correo electrónico: ogualavisi@ups.edu.ec / bioagrolab@ups.edu.ec

#### 4.B. Análisis final de los parámetros físico-químicos por tratamiento



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA  
SALESIANA**  
ECUADOR

**LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA**



**SALESIANOS  
DON BOSCO**  
ECUADOR

Pág. 1 de 1

**Cliente:** UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA  
**Dirección:** Avenida 12 de Octubre N24-22, Quito  
**Contacto:** Ing. Agr. Laura Huachi M.Sc.  
**Cantidad de muestras:** 1  
**Fecha de ingreso:** Noviembre 26, 2018  
**Característica de la Muestra:** Agua


**Tel/Cel.:** (+593) 3 962 900  
**E-mail:** [lhuchi@ups.edu.ec](mailto:lhuchi@ups.edu.ec)  
**Nº de Informe:** 18581  
**Fecha Emisión:** Enero 10, 2019  
**Fecha de Análisis:** Nov., 28 a dic. 03, 2018

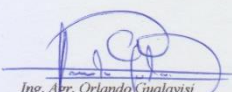
**INFORME DE RESULTADOS**

Identificación de Usuario <small>Código de laboratorio Parámetros</small>	Unidad	To <small>LSA18-798</small>	MÉTODO DE VALORACIÓN
DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO	mg/L	< 15,0	SM. 5220 D
CLORUROS	mg/L	70,92	SM. 4500-Cl-B
ARSÉNICO (*)	ug/L	9,95	SM. 3114 B
FOSFATOS	mg/L	0,14	SM. 4500-(PO3)-E
OXÍGENO DISUELTO	mg/L	3,7	SM. 5220: D
CALCIO	mg/L	46,55	
MAGNESIO	mg/L	23,88	SM 3111-B
SODIO	mg/L	35,95	
HIERRO	mg/L	0,16	


**DATOS ADICIONALES:**  
mg/L: miligramos por litro;  
 (\*) Los ensayos se realizaron al Laboratorio de Ensayo ALS acreditado por la SAE con Acreditación N° OAB LE 2C 05-005.  
SM: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22th Edition, 2012 -AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. "APHA"

**Observaciones**  
Los resultados corresponden únicamente a la(s) muestra(s) entregada(s) por el CLIENTE





Ing. Agr. Orlando Cevalavisi  
Técnico de Suelos y Agua



Quim. de Alim. Paola Simbaña  
Responsable de Laboratorio

**LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA**

---

Cayambe, Av. Natalia Jarrín N3-85 y 9 de Octubre. Teléfonos: 593 (2) 3962946 / 3962800 ext. 2504-2534.  
 Correo electrónico: [ogualavisi@ups.edu.ec](mailto:ogualavisi@ups.edu.ec) / [biogrolab@ups.edu.ec](mailto:biogrolab@ups.edu.ec)

**LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA**

Pág. 1 de 1

**Cliente:** UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

**Dirección:** Avenida 12 de Octubre N24-22, Quito

**Contacto:** Ing. Agr. Laura Huachi M.Sc.

**Cantidad de muestras:** 1

**Fecha de ingreso:** Noviembre 26, 2018

**Característica de la Muestra:** Agua

**Tel/Cel:** (+593) 3 962 900

**E-mail:** [luachi@ups.edu.ec](mailto:luachi@ups.edu.ec)

**Nº de Informe:** 18583

**Fecha Emisión:** Enero 10, 2019

**Fecha de Análisis:** Nov., 28 a dic. 03, 2018

**INFORME DE RESULTADOS**

Identificación de Usuario	Unidad	T I P	MÉTODO DE VALORACIÓN
Código de laboratorio		LSA18-800	
Parámetros			
DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO	mg/L	1004,00	SM. 5220 D
CLORUROS	mg/L	300,00	SM. 4500-Cl-B
ARSÉNICO (*)	ug/L	187,50	SM. 3114 B
POSFATOS	mg/L	33,06	SM. 4500-(PO3)-E
OXÍGENO DISUELTUO	mg/L	< 2,00	SM. 5220: D
CALCIO	mg/L	33,55	
MAGNESIO	mg/L	21,43	SM 3111-B
SODIO	mg/L	106,68	
HIERRO	mg/L	0,18	

**DATOS ADICIONALES:**


U pH: unidades; mg/L: miligramos por litro;

(\*) Los ensayos se realizaron al Laboratorio de Ensayo ALS acreditado por la SAE con Acreditación N° OAB LE 2C 05-005


SM: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater: 22th Edition, 2012 -AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. "APHA"

**Observaciones**

Los resultados corresponden únicamente a la(s) muestra(s) entregada(s) por el CLIENTE



Ing. Agr. Orlinda Guatavisi  
Técnico de Suelos y Agua



Quim. de Alim. Paola Simbaña  
Responsable de Laboratorio



**LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA**

Cayambe, Av. Natalia Jarrín N3-85 y 9 de Octubre. Teléfonos: 593 (2) 3962946 / 3962800 ext. 2504-2534.  
Correo electrónico: [ogualavisi@ups.edu.ec](mailto:ogualavisi@ups.edu.ec) / [bioagrolab@ups.edu.ec](mailto:bioagrolab@ups.edu.ec)

**LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA**

**Cliencia:** UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

**Dirección:** Avenida 12 de Octubre N24-22, Quito

**Contacto:** Ing. Agr. Laura Huachi M.Sc.

**Cantidad de muestras:** 1

**Fecha de ingreso:** Noviembre 26, 2018

**Característica de la Muestra:** Agua

**Tel/Cel.:** (+593) 3 962 900

**E-mail:** [luachi@ups.edu.ec](mailto:luachi@ups.edu.ec)

**Nº de Informe:** 18582

**Fecha Emisión:** Enero 10, 2019

**Fecha de Análisis:** Nov., 28 a dic. 03, 2018

**INFORME DE RESULTADOS**

Identificación de Usuario Código de laboratorio Parámetros	Unidad	T2 TH LSA18-799	MÉTODO DE VALORACIÓN
DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO	mg/L	966,00	SM. 5220 D
CLORUROS	mg/L	372,36	SM. 4500-Cl-B
ARSÉNICO (*)	ug/L	1010,00	SM. 3114 B
FOSFATOS	mg/L	97,98	SM. 4500-(PO <sub>3</sub> )-E
OXÍGENO DISUELTUO	mg/L	< 2,00	SM. 5220: D
CALCIO	mg/L	37,38	
MAGNESIO	mg/L	24,84	SM 3111-B
SODIO	mg/L	99,89	
HIERRO	mg/L	0,90	

**DATOS ADICIONALES:**

U p/L: unidades; mg/L: miligramos por litro;

(\*) Los ensayos se realizaron al Laboratorio de Ensayo ALS acreditado por la SAE con Acreditación N° OAB LB 2C 03-005.


SM: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22th Edition, 2012 -AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. "APHA"

**Observaciones**

Los resultados corresponden únicamente a la(s) muestra(s) entregada(s) por el CLIENTE



Ing. Agr. Orlando Gualavisi  
Técnico de Suelos y Agua



Quim. de Alim. Paola Simbaña  
Responsable de Laboratorio



**LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA**

Cayambe, Av. Natalia Jarrín N3-85 y 9 de Octubre. Teléfonos: 593 (2) 3962946 / 3962800 ext. 2504-2534.  
Correo electrónico: [ogualavisi@ups.edu.ec](mailto:ogualavisi@ups.edu.ec) / [bioagrolab@ups.edu.ec](mailto:bioagrolab@ups.edu.ec)



LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA

**Cliente:** UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

**Dirección:** Avenida 12 de Octubre N24-22, Quito

**Contacto:** Ing. Agr. Laura Huachi M.Sc.

**Cantidad de muestras:** 1

**Fecha de ingreso:** Noviembre 26, 2018

**Característica de la Muestra:** Agua

**Tel/Cel.:** (+593) 3 962 900

**E-mail:** [luachi@ups.edu.ec](mailto:luachi@ups.edu.ec)

**Nº de Informe:** 18585

**Fecha Emisión:** Enero 10, 2019

**Fecha de Análisis:** Nov., 28 a dic. 03, 2018

INFORME DE RESULTADOS

Identificación de Usuario Código de laboratorio Parámetros	Unidad	T3 Pa LSA18-802	MÉTODO DE VALORACIÓN
DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO	mg/L	50,00	SM. 5220 D
CLORUROS	mg/L	381,90	SM. 4500-Cl-B
ARSÉNICO (*)	ug/L	641,25	SM. 3114 B
FOSFATOS	mg/L	2,54	SM. 4500-(PO3)-E
OXÍGENO DISUELTUO	mg/L	< 2,00	SM. 5220: D
CALCIO	mg/L	27,42	
MAGNESIO	mg/L	22,77	SM 3111-B
SODIO	mg/L	111,64	
HIERRO	mg/L	0,22	

DATOS ADICIONALES:

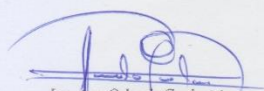
mg/L: miligramos por litro;

(\*) Los ensayos se realizaron al Laboratorio de Ensayo ALS acreditado por la SAE con Acreditación Nº OAE 1E 2C 05-005.


SM: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater: 22th Edition, 2012 -AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION: "APHA"

Observaciones

Los resultados corresponden únicamente a la(s) muestra(s) entregada(s) por el CLIENTE



Ing. Agr. Orlando Gualavisi  
Técnico de Suelos y Agua



Quím. de Alim. Paola Simbaña  
Responsable de Laboratorio



LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA

Cayambe, Av. Natalia Jarrín N3-85 y 9 de Octubre. Teléfonos: 593 (2) 3962946 / 3962800 ext. 2504-2534.  
Correo electrónico: [ogualavisi@ups.edu.ec](mailto:ogualavisi@ups.edu.ec) / [bioagrolab@ups.edu.ec](mailto:bioagrolab@ups.edu.ec)

LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA

Pág. 1 de 1

**Cliente:** UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

**Dirección:** Avenida 12 de Octubre N24-22, Quito

**Contacto:** Ing. Agr. Laura Huachi M.Sc.

**Cantidad de muestras:** 1

**Fecha de ingreso:** Noviembre 26, 2018

**Característica de la Muestra:** Agua

**Tel/Cel.:** (+593) 3 962 900

**E-mail:** [luachi@ups.edu.ec](mailto:luachi@ups.edu.ec)

**Nº de Informe:** 18584

**Fecha Emisión:** Enero 10, 2019

**Fecha de Análisis:** Nov., 28 a dic. 03, 2018

INFORME DE RESULTADOS

Identificación de Usuario	Unidad	T4 P	MÉTODO DE VALORACIÓN
Código de laboratorio		LSA18-801	
Parámetros			
DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXÍGENO	mg/L	830,00	SM. 5220 D
CLORUROS	mg/L	313,70	SM. 4500-Cl-B
ARSÉNICO (*)	ug/L	601,25	SM. 3114 B
FOSFATOS	mg/L	45,17	SM. 4500-PO3-E
OXÍGENO DISUELTTO	mg/L	< 2,00	SM. 5220-D
CALCIO	mg/L	32,61	
MAGNESIO	mg/L	19,75	SM 3111-B
SODIO	mg/L	98,12	
HIERRO	mg/L	0,89	

**DATOS ADICIONALES:**


mg/L, miligramos por litro;

(\*) Los ensayos se realizaron al Laboratorio de Ensayo ALS acreditado por la SAE con Acreditación N° OAB LE 2C 05-005.


SM.: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22th Edition, 2012 -AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. "APHA"

**Observaciones**

Los resultados corresponden únicamente a la(s) muestra(s) entregada(s) por el CLIENTE



Ing. Agr. Orlando Cuatavisci  
Técnico de Suelos y Agua



Quim. de Alim. Paola Simbaña  
Responsable de Laboratorio



LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA

Cayambe, Av. Natalia Jarrín N3-85 y 9 de Octubre. Teléfonos: 593 (2) 3962946 / 3962800 ext. 2504-2534.  
Correo electrónico: [ogualavisi@ups.edu.ec](mailto:ogualavisi@ups.edu.ec) / [bioagrolab@ups.edu.ec](mailto:bioagrolab@ups.edu.ec)

#### 4.C. Análisis final de sólidos totales por tratamiento



#### LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA

Pág. 1 de 1

**Cliente:** UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

**Dirección:** Avenida 12 de Octubre N24-22, Quito

**Contacto:** Ing. Agr. Laura Huachi M.Sc.

**Cantidad de muestras:** 4

**Fecha de de ingreso:** Noviembre 26, 2018

**Característica de la Muestra:** Agua

**Tel/Cel.:** (+593) 3 962 900

**E-mail:** [luachi@ups.edu.ec](mailto:luachi@ups.edu.ec)

**Nº de Informe:** 18586

**Fecha Emisión:** Enero 08, 2019

**Fecha de Análisis:** Nov. 29 a Dic. 14, 2018

#### INFORME DE RESULTADOS

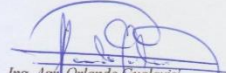
Código Laboratorio	Identificación del Cliente	PARÁMETRO	MÉTODO DE VALORACIÓN
		SÓLIDOS TOTALES (mg/L)	
LSA18-803	SEDIMENTO T1 P	5,13	
LSA18-804	SEDIMENTO T2 PH	15,82	
LSA18-805	SEDIMENTO T3 Pa	3,34	SM 2540: B
LSA18-806	SEDIMENTO T4 C	7,51	


#### DATOS ADICIONALES:

mg/L: miligramos por litro;

#### Observaciones

Los resultados corresponden únicamente a la(s) muestra(s) entregada(s) por el CLIENTE

  
Ing. Agr. Orlando Guavalvisi  
Técnico de Suelos y Agua

  
Quim. de Alim. Paola Simbaña  
Responsable de Laboratorio



LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA

Cayambe, Av. Natalia Jarrín N3-85 y 9 de Octubre. Teléfonos: 593 (2) 3962946 / 3962800 ext. 2504-2534.

Correo electrónico: [ogualavisi@ups.edu.ec](mailto:ogualavisi@ups.edu.ec) / [bioagrolab@ups.edu.ec](mailto:bioagrolab@ups.edu.ec)

#### 4.D. Concentración final de Arsénico por tratamiento



#### LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA

Pág. 1 de 1

**Cliente:** UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

**Dirección:** Avenida 12 de Octubre N24-22, Quito

**Contacto:** Ing. Agr. Laura Huachi M.Sc.

**Cantidad de muestras:** 9

**Fecha de ingreso:** Noviembre 26, 2018

**Característica de la Muestra:** Agua

**Tel/Cel.:** (+593) 3 962 900

**E-mail:** lhuachi@ups.edu.ec

**Nº de Informe:** 18590

**Fecha Emisión:** Enero 08, 2019

**Fecha de Análisis:** Nov. 26, 2018 al 02 Enero, 2019

#### INFORME DE RESULTADOS

Código Laboratorio	Identificación del Cliente	PARÁMETRO	MÉTODO DE VALORACIÓN
		ARSÉNICO (*) (ug/L)	
LSA18-805	SEDIMENTO T3 Pa	< 2,00	
LSA18-807	T3 Pa1	266,50	
LSA18-808	T3 Pa2	840,00	
LSA18-809	T3 Pa3	1105,00	
LSA18-810	T3 Pa4	557,50	SM 3114 B
LSA18-811	T4 C1	212,00	
LSA18-812	T4 C2	474,00	
LSA18-813	T4 C3	500,00	
LSA18-814	T4 C4	269,50	

#### DATOS ADICIONALES:

ug/L: microgramos por litro;

(\*) Los ensayos se realizaron en el Laboratorio de Ensayo ALS acreditado por la SAE con Acreditación N° OAE LE 2C 05-005.

#### Observaciones

Los resultados corresponden únicamente a la(s) muestra(s) entregada(s) por el CLIENTE

Ing. Agr. Orlando Gualavisi  
Técnico de Suelos y Agua

Quim. de Alim. Paola Simbaña  
Responsable de Laboratorio



#### LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA

Cayambe, Av. Natalia Jarrín N3-85 y 9 de Octubre. Teléfonos: 593 (2) 3962946 / 3962800 ext. 2504-2534.

Correo electrónico: ogualavisi@ups.edu.ec / bioagrolab@ups.edu.ec

LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA

Pág. 1 de 1

Cliente: UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

Dirección: Avenida 12 de Octubre N24-22, Quito

Contacto: Ing. Agr. Laura Huachi M.Sc.

Tel/Cel.: (+593) 3 962 900

E-mail: [luachi@ups.edu.ec](mailto:luachi@ups.edu.ec)

Cantidad de muestras: 8

Nº de Informe: 18591

Fecha de ingreso: Noviembre 26, 2018

Fecha Emisión: Enero 08, 2019

Característica de la Muestra: Agua

Fecha de Análisis: Nov. 26, 2018 al 02 Enero, 2019

INFORME DE RESULTADOS

Código Laboratorio	Identificación del Cliente	PARÁMETRO	MÉTODO DE VALORACIÓN
		ARSENICO (*) (ug/L)	
LSA18-815	T2 TH1	376,50	
LSA18-816	T2 TH2	440,50	
LSA18-817	T2 TH3	254,00	
LSA18-818	T2 TH4	515,00	
			SM 3114 B
LSA18-819	T1 P1	136,50	
LSA18-820	T1 P2	184,00	
LSA18-821	T1 P3	402,50	
LSA18-822	T1 P4	158,50	

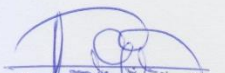
DATOS ADICIONALES:

ug/L: microgramos por litro;


(\*) Los ensayos se realizaron en el Laboratorio de Ensayo ALS acreditado por la SAE con Acreditación N° OAE LE 2C 05-005.

Observaciones

Los resultados corresponden únicamente a la(s) muestra(s) entregada(s) por el CLIENTE



Ing. Agr. Orlando Gualavisi  
Técnico de Suelos y Agua



Quím. de Alim. Paola Simbaña  
Responsable de Laboratorio



LABORATORIO DE SUELOS Y AGUA

Cayambe, Av. Natalia Jarrín N3-85 y 9 de Octubre. Teléfonos: 593 (2) 3962946 / 3962800 ext. 2504-2534.  
Correo electrónico: [ogualavisi@ups.edu.ec](mailto:ogualavisi@ups.edu.ec) / [bioagrolab@ups.edu.ec](mailto:bioagrolab@ups.edu.ec)

**Anexo 5.** Datos de Variables (Temperatura, potencial de hidrógeno y conductividad eléctrica).

5. A. Datos de Temperatura (°C)

<b>Tratamientos</b>	<b>T0</b>				<b>T1</b>				<b>T2</b>				<b>T3</b>				<b>T4</b>			
<b>Repeticiones</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
28/08/2018	18.00	17.80	17.90	17.70	19.80	19.70	19.70	19.70	20.50	20.50	20.50	20.50	20.10	20.10	20.10	20.10	19.60	19.60	19.60	19.60
31/08/2018	18.50	17.60	17.70	17.40	18.40	18.10	18.30	19.50	18.20	18.00	18.00	18.90	18.40	18.20	18.20	19.90	18.40	18.30	18.50	18.50
04/09/2018	18.40	18.70	17.60	17.60	18.30	18.20	18.30	18.00	18.10	18.10	18.20	18.00	18.30	18.30	18.20	18.30	18.20	18.40	18.50	18.40
07/09/2018	18.50	18.60	18.50	18.40	18.50	18.40	18.40	18.00	18.00	18.10	18.10	18.00	18.40	18.50	18.50	18.30	18.40	18.40	18.30	18.40
11/09/2018	17.50	17.60	17.60	17.50	18.50	18.50	18.40	18.50	18.00	18.20	18.10	18.20	18.40	18.60	18.50	18.40	18.40	18.50	18.30	18.40
14/09/2018	17.10	17.10	17.30	17.10	17.30	17.30	17.00	17.40	17.00	17.40	17.10	17.30	17.20	17.40	17.30	17.10	17.20	15.00	17.10	17.30
18/09/2018	17.30	17.40	17.60	17.40	17.60	17.60	17.30	17.60	17.30	17.40	17.20	17.30	17.50	17.60	17.60	17.50	17.50	15.50	17.40	17.50
25/09/2018	18.50	18.30	18.40	18.50	18.70	18.60	18.60	18.70	18.60	18.40	18.50	18.50	18.70	18.50	18.70	18.60	18.70	18.60	18.60	18.70
02/10/2018	17.90	18.20	18.30	18.30	18.50	18.60	18.60	18.70	18.30	18.20	18.30	18.20	18.60	18.40	18.60	18.50	18.50	18.40	18.50	18.50
05/10/2018	18.00	18.10	18.30	17.90	18.30	18.10	18.00	18.10	17.90	18.00	18.10	18.20	18.20	18.00	18.20	18.30	18.30	18.10	18.20	18.20
09/10/2018	18.00	18.10	18.00	18.20	18.20	18.30	18.30	18.20	18.00	18.20	18.10	18.00	18.30	18.00	18.20	18.30	18.20	18.10	18.00	18.20
12/10/2018	17.90	17.80	18.10	17.80	18.30	18.30	17.90	18.30	18.10	18.10	18.20	18.00	18.20	18.20	18.00	18.00	18.00	18.00	17.80	18.30
16/10/2018	17.90	17.90	18.00	17.80	18.00	18.10	18.00	18.20	17.00	17.80	17.90	18.00	18.10	18.20	18.00	18.00	18.00	18.00	18.10	18.30
19/10/2018	18.00	18.00	18.00	18.00	18.00	18.00	18.10	18.00	18.00	18.10	18.30	18.00	17.90	18.00	17.80	17.90	18.00	18.00	18.00	18.00
23/10/2018	17.40	17.50	17.50	17.50	17.50	17.90	17.60	17.60	17.70	17.50	17.60	17.70	17.30	17.60	17.60	17.40	17.40	17.40	17.40	17.40
26/10/2018	18.10	18.20	18.10	18.10	18.30	18.30	18.10	18.20	18.20	18.70	18.00	18.00	18.00	18.00	18.00	18.10	18.00	18.00	18.10	18.30
30/10/2018	18.10	18.10	18.20	18.20	18.10	18.10	18.20	18.20	18.10	17.80	17.50	18.00	18.00	17.90	18.20	18.00	18.00	18.10	18.20	18.40
02/11/2018	18.20	18.10	18.00	18.00	18.30	18.50	18.40	18.40	18.00	18.50	18.30	18.20	17.80	18.20	18.20	18.30	17.40	18.00	18.20	18.00
06/11/2018	18.00	17.80	17.90	17.70	17.80	17.80	17.80	17.80	17.80	17.70	17.70	17.80	17.60	17.70	17.80	17.80	17.50	17.50	17.60	17.50
09/11/2018	17.40	17.40	17.30	17.10	17.90	18.00	18.00	17.90	17.90	17.50	17.60	17.90	17.90	17.60	17.80	17.60	17.30	17.70	17.60	17.70
13/11/2018	17.00	17.00	17.40	17.10	17.10	17.40	17.30	17.20	17.10	17.00	17.20	17.40	17.30	17.10	17.20	17.30	16.90	17.00	17.10	17.20
16/11/2018	17.10	17.30	17.30	17.50	17.20	17.40	17.30	17.20	17.00	17.10	17.10	17.40	17.00	17.10	17.10	17.20	17.00	17.10	17.10	17.20

Elaborado por: (Las autoras, 2019).

5. B. Datos de conductividad eléctrica

Tratamientos	T0				T1				T2				T3				T4			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
28/08/2018	85.00	87.00	86.00	87.00	70.00	72.00	73.00	72.00	46.00	48.00	45.00	44.00	40.00	43.00	47.00	45.00	33.00	36.00	39.00	38.00
31/08/2018	86.00	88.00	88.00	89.00	72.00	75.00	75.00	71.00	57.00	53.00	47.00	56.00	42.00	45.00	49.00	45.00	35.00	38.00	41.00	83.00
04/09/2018	84.00	87.00	87.00	91.00	70.00	77.00	78.00	72.00	56.00	54.00	50.00	57.00	40.00	46.00	50.00	49.00	33.00	39.00	42.00	85.00
07/09/2018	87.00	87.00	89.00	88.00	46.00	42.00	42.00	45.00	47.00	46.00	48.00	49.00	42.00	48.00	48.00	51.00	65.00	84.00	84.00	83.00
11/09/2018	86.00	87.00	89.00	88.00	34.00	35.00	35.00	37.00	58.00	36.00	37.00	42.00	49.00	48.00	49.00	52.00	82.00	84.00	86.00	85.00
14/09/2018	79.00	82.00	79.00	78.00	33.00	85.00	36.00	38.00	38.00	37.00	38.00	43.00	50.00	49.00	50.00	53.00	83.00	82.00	87.00	86.00
18/09/2018	80.00	81.00	76.00	77.00	28.00	82.00	33.00	35.00	33.00	34.00	35.00	40.00	45.00	46.00	47.00	50.00	78.00	83.00	84.00	87.00
25/09/2018	82.00	82.00	79.00	78.00	25.00	29.00	31.00	33.00	32.00	32.00	34.00	35.00	43.00	44.00	46.00	48.00	77.00	79.00	81.00	86.00
02/10/2018	83.00	82.00	79.00	79.00	22.00	25.00	29.00	30.00	29.00	30.00	31.00	32.00	41.00	43.00	45.00	46.00	76.00	79.00	80.00	84.00
05/10/2018	83.00	83.00	79.00	79.00	20.00	78.00	25.00	29.00	28.00	27.00	29.00	31.00	40.00	41.00	43.00	44.00	75.00	74.00	78.00	83.00
09/10/2018	84.00	80.00	81.00	80.00	15.00	16.00	20.00	25.00	22.00	33.00	26.00	27.00	39.00	40.00	38.00	39.00	70.00	74.00	73.00	81.00
12/10/2018	85.00	85.00	84.00	83.00	11.00	19.00	17.00	18.00	19.00	20.00	17.00	24.00	36.00	35.00	37.00	38.00	70.00	70.00	72.00	71.00
16/10/2018	86.00	87.00	86.00	85.00	11.00	14.00	14.00	24.00	19.00	35.00	48.00	27.00	36.00	44.00	35.00	44.00	70.00	72.00	74.00	81.00
19/10/2018	86.00	87.00	87.00	87.00	11.00	14.00	14.00	15.00	30.00	35.00	35.00	30.00	36.00	44.00	48.00	44.00	70.00	72.00	79.00	80.00
23/10/2018	86.00	87.00	88.00	87.00	52.00	50.00	53.00	58.00	70.00	68.00	70.00	64.00	64.00	62.00	70.00	74.00	70.00	68.00	71.00	64.00
26/10/2018	88.00	90.00	89.00	88.00	48.00	61.00	45.00	83.00	93.00	58.00	126.00	117.00	119.00	126.00	114.00	130.00	152.00	155.00	126.00	156.00
30/10/2018	87.00	90.00	91.00	92.00	84.00	84.00	86.00	88.00	100.00	106.00	124.00	117.00	105.00	120.00	132.00	128.00	152.00	153.00	124.00	153.00
02/11/2018	88.00	90.00	91.00	90.00	77.00	83.00	83.00	85.00	99.00	88.00	113.00	100.00	128.00	130.00	137.00	139.00	124.00	110.00	112.00	109.00
06/11/2018	85.00	89.00	89.00	90.00	97.00	98.00	98.00	100.00	107.00	102.00	115.00	107.00	107.00	105.00	104.00	104.00	107.00	108.00	106.00	107.00
09/11/2018	95.00	97.00	99.00	100.00	90.00	93.00	92.00	94.00	100.00	105.00	109.00	97.00	100.00	102.00	102.00	102.00	104.00	102.00	102.00	97.00
13/11/2018	110.00	110.00	110.00	112.00	111.00	109.00	111.00	113.00	116.00	117.00	124.00	117.00	115.00	113.00	112.00	115.00	120.00	114.00	117.00	114.00
16/11/2018	110.00	110.00	110.00	112.00	111.00	112.00	110.00	115.00	117.00	122.00	122.00	116.00	116.00	112.00	112.00	114.00	117.00	122.00	114.00	113.00
20/11/2018	129.00	129.00	128.00	130.00	153.00	151.00	152.00	152.00	154.00	156.00	164.00	155.00	153.00	151.00	151.00	151.00	154.00	155.00	154.00	153.00
23/11/2018	130.00	130.00	130.00	130.00	152.00	150.00	151.00	151.00	153.00	155.00	163.00	154.00	152.00	155.00	15.00	150.00	153.00	154.00	153.00	152.00

Elaborado por: (Las autoras, 2019).

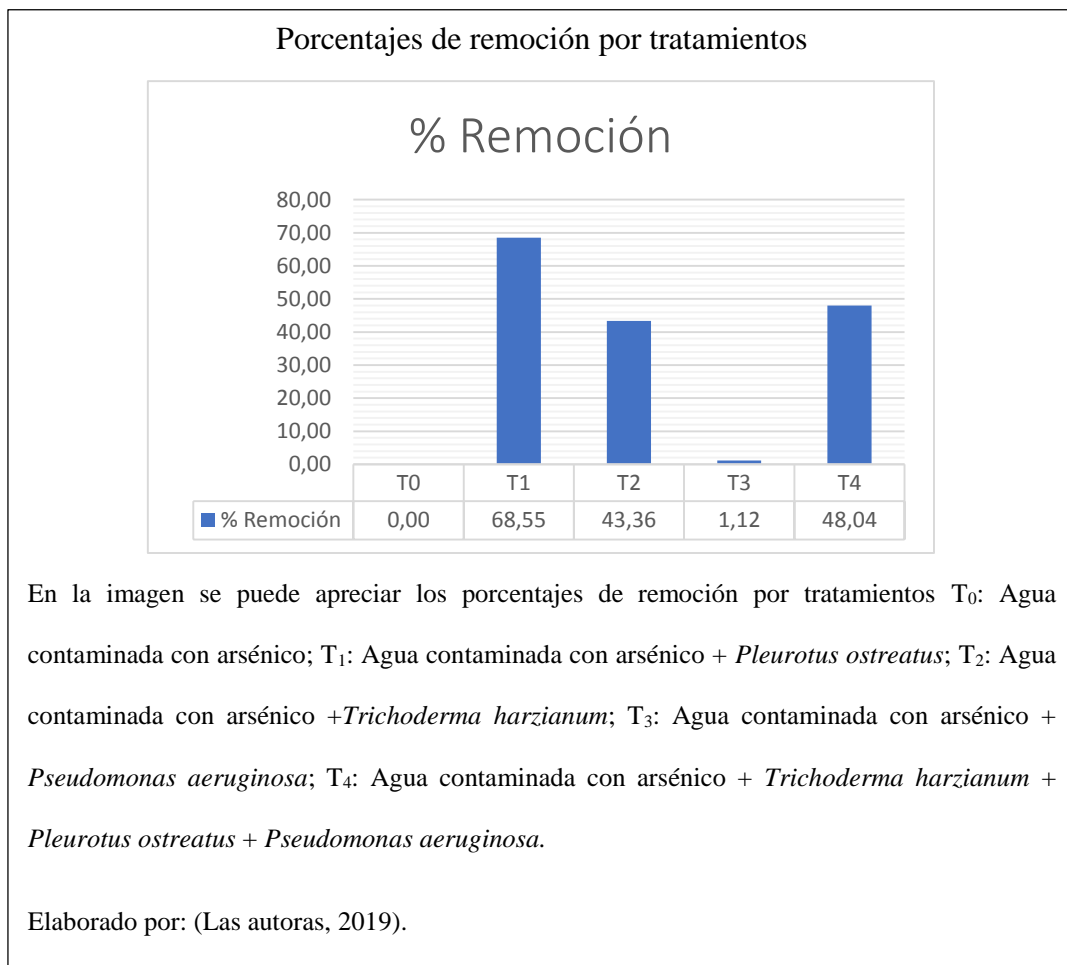
5. C. Datos de Potencial de hidrógeno (pH)

Tratamientos	T0				T1				T2				T3				T4			
Repeticiones	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
28/08/2018	9.00	9.40	9.20	9.30	9.20	9.00	9.00	9.10	9.20	9.10	9.10	9.00	9.20	9.10	9.20	9.00	9.20	9.10	9.20	9.20
31/08/2018	9.40	9.60	9.50	9.60	9.00	8.70	8.90	9.00	9.10	9.00	8.90	9.00	9.00	8.90	9.50	8.90	8.80	9.00	9.10	9.10
04/09/2018	9.30	9.40	9.50	9.50	9.00	9.30	9.00	9.10	9.30	9.00	9.50	9.00	9.20	9.10	9.20	9.20	9.50	9.30	9.20	9.50
07/09/2018	9.40	9.50	9.40	9.50	9.00	9.20	8.90	9.00	9.20	8.90	9.10	9.20	9.30	9.20	9.10	9.10	9.40	9.20	9.10	9.20
11/09/2018	9.50	9.40	9.40	9.50	9.10	9.00	9.30	9.00	5.30	5.20	5.40	5.10	9.00	8.70	9.10	9.30	8.10	8.50	8.30	8.50
14/09/2018	9.50	9.20	9.10	9.00	9.10	9.00	9.20	9.10	6.50	6.10	5.40	5.10	9.00	9.10	9.00	9.20	9.10	7.70	7.60	7.70
18/09/2018	9.10	9.10	9.00	9.00	9.00	9.10	9.30	9.40	4.70	6.20	5.30	5.10	9.00	8.70	9.10	9.30	7.80	7.90	7.70	7.90
25/09/2018	9.10	9.00	9.00	9.00	9.10	9.00	9.30	9.20	5.00	5.20	5.00	9.00	9.20	9.00	9.20	9.00	8.00	8.40	8.20	8.00
02/10/2018	9.10	9.00	9.10	9.10	9.00	9.10	9.20	9.10	5.10	5.30	5.10	5.20	9.30	9.10	9.30	9.10	7.90	8.10	8.00	7.80
05/10/2018	9.10	9.00	9.10	9.10	8.90	8.00	9.30	9.00	5.10	6.10	5.80	5.60	9.00	8.70	9.20	9.00	7.80	9.10	8.30	7.90
09/10/2018	9.30	9.10	9.00	9.00	9.00	9.20	9.10	9.10	5.00	5.20	5.00	5.10	9.10	8.90	9.10	8.90	7.90	8.10	8.20	8.00
12/10/2018	9.00	9.20	9.10	9.00	9.20	9.00	9.10	8.10	5.20	5.40	5.30	5.80	9.00	8.50	9.20	9.00	7.90	8.00	8.10	8.20
16/10/2018	9.10	9.00	9.20	9.10	8.90	8.40	8.30	8.30	8.50	4.60	5.70	5.80	9.10	9.10	9.10	9.00	8.40	8.30	8.40	8.30
19/10/2018	9.00	9.10	9.00	9.10	9.00	8.80	9.00	8.50	6.00	6.00	4.60	8.80	8.80	8.80	8.90	9.20	8.40	8.40	8.90	8.70
23/10/2018	9.10	9.10	9.00	9.20	8.60	8.40	8.70	9.20	6.60	6.00	4.80	8.40	8.70	8.50	8.70	8.40	9.00	8.90	8.90	9.20
26/10/2018	9.00	9.20	9.10	8.90	8.20	8.30	8.70	8.90	6.40	6.20	4.80	8.40	8.50	8.60	8.70	8.60	9.20	9.10	8.60	9.10
30/10/2018	9.00	9.00	9.00	9.00	8.90	8.10	9.10	9.00	8.50	8.50	4.90	8.90	9.10	8.90	8.80	9.20	9.10	9.10	8.90	8.50
02/11/2018	9.30	9.40	9.40	9.30	8.30	7.70	8.50	8.00	8.30	8.50	4.80	8.60	8.80	8.80	8.70	9.00	8.60	8.70	9.00	8.80
06/11/2018	9.30	9.40	9.40	9.40	8.80	7.90	8.90	8.50	8.50	8.60	4.60	8.80	9.10	8.60	8.70	8.50	8.80	9.00	9.00	8.50
09/11/2018	9.50	9.60	9.60	9.70	8.60	7.30	8.90	8.40	8.80	8.70	4.90	8.70	9.20	9.10	8.60	8.70	8.80	9.10	9.10	8.50
13/11/2018	9.60	9.70	9.70	9.70	7.90	9.20	9.10	7.20	9.00	8.90	5.00	9.70	9.30	8.70	8.80	9.00	8.80	9.00	8.90	8.50

Elaborado por: (Las autoras, 2019).



**Anexo 6.** Gráfica promedio de porcentaje de remoción de As por cada tratamiento



## Anexo 7. Fase Experimental

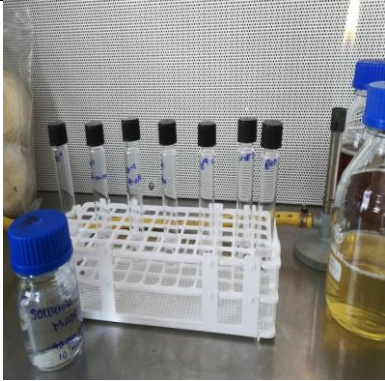
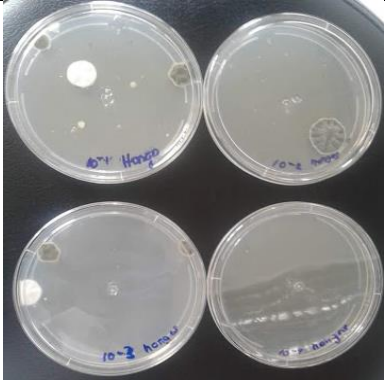
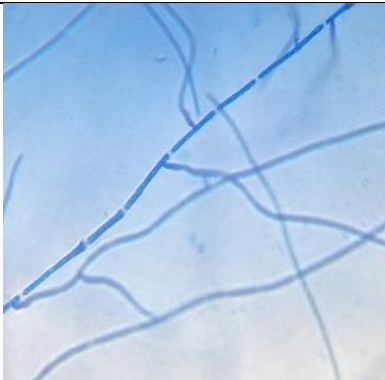

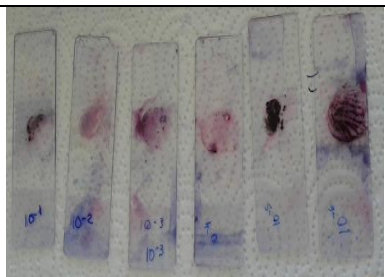
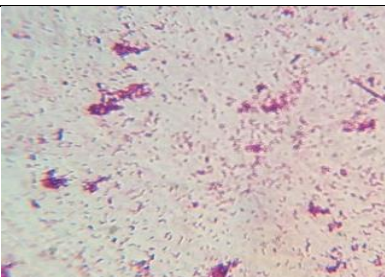
### 7.A. Recolección de las muestras de agua desde la fuente

	
a. Agua de la fuente Ilinzas	b. Agua del reservorio
	
c. Agua del Río Blanco y el Río Pucahuaico	d. Agua de la fuente que surte los ríos
	
e. Recolección agua para diseño experimental	f. Recolección agua análisis en el laboratorio



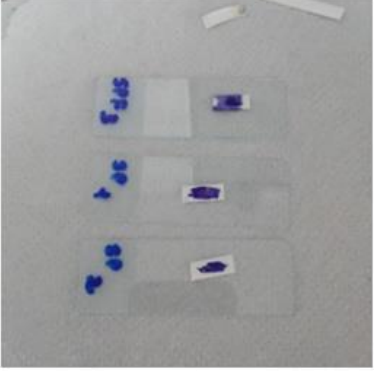



Nota: Elaborado por: (Las autoras, 2019).

7.B. Fase de laboratorio (carga microbiana, identificación, masificación y elaboración de inóculos).

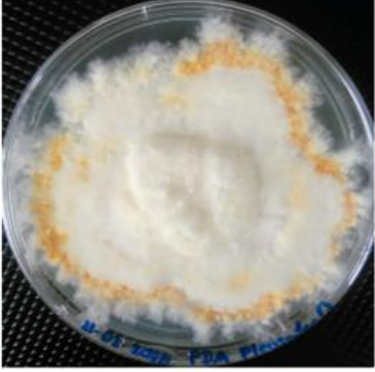

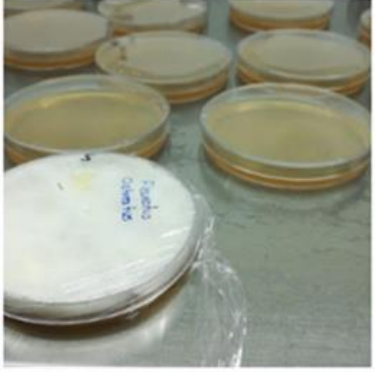


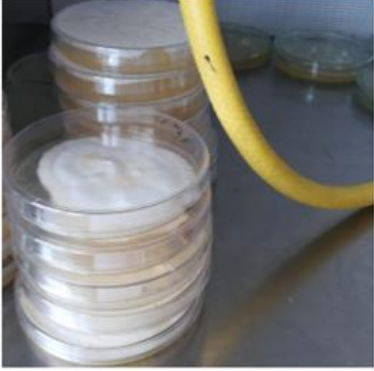
**Observación general de la carga microbiana de la muestra de agua**

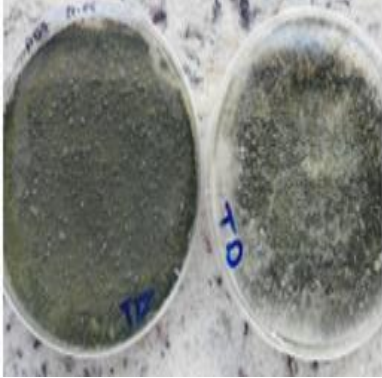
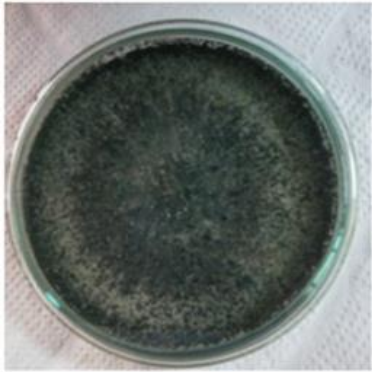
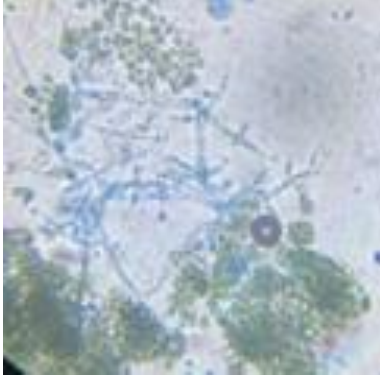

	
<p>a. Solución madre</p>	<p>b. Resultados de siembra diluciones en Saburoud</p>
	
<p>c. Presencia de hifas</p>	<p>d. Resultados de siembra diluciones en TSA</p>
	
<p>e. Placas tinción gran</p>	<p>f. Presencia de bacilos gran negativos y positivos</p>

## Reactivación de *Pseudomonas aeruginosa*

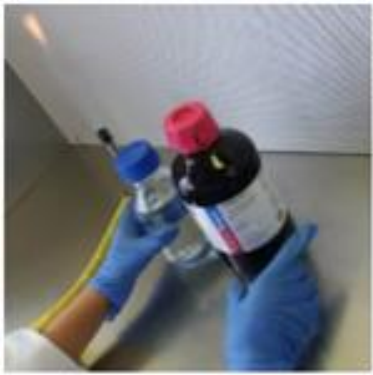




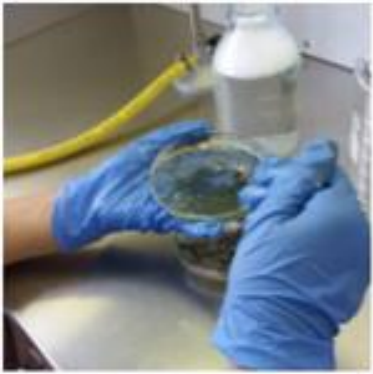
	
a. Reactivación de cepas	b. Obtención de <i>P. aeruginosa</i>
	
c. Resultados prueba de Catalasa positiva	d. Siembra de <i>P. aeruginosa</i>
	
e. Presencia de pigmentos	f. Siembra por estría

**Reactivación y siembra de *Trichoderma harzinum* y *Pleurotus ostreatus***

	
<p>a. Selección de cepas de <i>P. ostreatus</i></p>	<p>b. Obtención de cepa de <i>P. ostreatus</i></p>
	
<p>c. Siembra de <i>P. ostreatus</i></p>	<p>d. Obtención de <i>P. ostreatus</i></p>
	
<p>e. Crecimiento radial de <i>P. ostreatus</i></p>	<p>f. Masificación de <i>P. ostreatus</i></p>

	
<p>g. Selección de cepa de <i>T. harzianum</i></p>	<p>h. Obtención de cepa de <i>T. harzianum</i></p>
	
<p>i. Identificación de estructuras de <i>T. harzianum</i></p>	<p>j. Masificación alternativa de <i>T. harzianum</i></p>

## Elaboración de inóculos

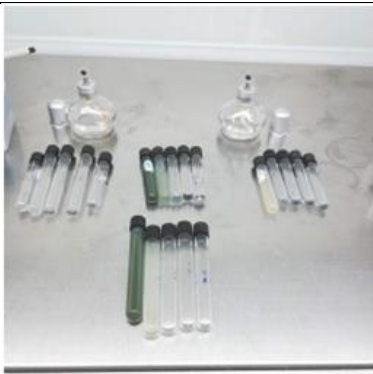
	
<p>a. Elaboración de solución agua-Tween</p>	<p>b. Mezcla de agua-tween para obtención de esporas</p>
	
<p>c. Agitación de la mezcla</p>	<p>d. Esterilización de espátula</p>
	
<p>e. Raspado de <i>T. harzinum</i></p>	<p>f. Enjuague de raspado de <i>T. harzinum</i></p>



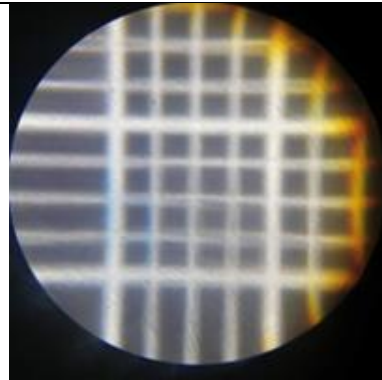
g. Obtención de inóculo de *T. harzianum*



h. Homogenización de inóculo para conteo en cámara de Neubauer



i. Diluciones para conteo y obtención de concentración



j. Conteo de esporas









k. Dilución de inóculo a la concentración deseada



l. Obtención del inóculo de *Trichoderma harzianum*



	
<p>m. Obtención de mezcla agua-Tween</p>	<p>n. Selección de cepas para inóculo de <i>P. ostreaus</i></p>
	
<p>o. Inicio de raspado para inóculo de <i>P. ostreaus</i></p>	<p>p. Obtención de micelio para inóculo de <i>P. ostreaus</i></p>
	
<p>q. Obtención de inóculo <i>P. ostreaus</i></p>	<p>r. Dilución de inóculo de <i>P. ostreaus</i> a la concentración deseada</p>

Nota: Elaborado por: (Las autoras, 2019).