



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

**“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA
MICROBIOTA NATIVA DE MUESTRAS DE EFLUENTES DE
CURTIEMBRES”**

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORA: VANESSA PAMELA NAVARRETE VILLA

TUTOR: DR. GERARDO MEDINA PhD.

Riobamba - Ecuador

2017

© 2017, **Vanessa Pamela Navarrete Villa.**

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

El Tribunal de trabajo de titulación certifica que: El proyecto de investigación: **“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA NATIVA DE MUESTRAS DE EFLUENTES DE CURTIEMBRES”**, de responsabilidad de la señorita egresada Vanessa Pamela Navarrete Villa, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

NOMBRE

FIRMA

FECHA

Dr. Gerardo Medina PhD.

DIRECTOR DE TRABAJO

DE TITULACIÓN

Dra. Yolanda Díaz MSc.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Vanessa Pamela Navarrete Villa, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este trabajo de titulación, y el patrimonio intelectual del trabajo de titulación, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

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

Vanessa Pamela Navarrete Villa

C.C. 1803330271

DEDICATORIA

A aquel ser supremo que ha guiado y bendecido mi vida en cada momento. A mis padres y hermanos, quienes siempre han sido incondicionales para mi vida con su amor y apoyo; así como a todas aquellas personas que han creído en mí.

AGRADECIMIENTO

A Dios, fuente de vida y sabiduría, quien me ha permitido alcanzar una de mis metas deseadas, quien ha llenado mi vida de amor y puesto maravillosas personas en mi camino.

A mis padres, por cada sacrificio tomado, por cada valiosa enseñanza, por su amor y apoyo infinito y a mis hermanos.

A mis profesores Dr. Gerardo Medina PhD y MSc. Yolanda Díaz, por su valioso tiempo, paciencia y orientación en el transcurso de esta investigación.

A MSc. Maritza Yáñez e Ing. Carla Haro, así como a todos los técnicos, docentes y colegas con quienes compartí experiencias enriquecedoras a lo largo de este tiempo.

A la empresa Curtiembre Quisapincha, por la apertura y colaboración brindada hacia sus instalaciones.

A una de las personas a quien más admiro y amo, Cristhian, por impulsarme a ser cada día mejor y recordarme el valor que represento.

A todas aquellas personas que formaron y forman parte importante de mi vida, quienes me han enseñado el significado de la amistad y hemos recorrido parte del camino juntos.

Vanessa Navarrete

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	XI
SUMMARY.....	XII
CAPÍTULO I:	
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Identificación del problema.....	1
1.2 Justificación de la investigación.....	2
1.3 Objetivos.....	3
1.3.1 <i>Objetivo General</i>	3
1.3.2 <i>Objetivos Específicos</i>	3
CAPÍTULO II:	
2. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1 Antecedentes de la Investigación.....	5
2.2 Marco conceptual.....	6
2.2.1 <i>Metales pesados</i>	6
2.2.2 <i>La Industria del Cuero</i>	13
2.2.3 <i>Biorremediación</i>	17
2.2.4 <i>Técnicas de análisis microbiológico</i>	21
2.2.5 <i>Legislación</i>	24
CAPÍTULO III:	
3. MARCO METODOLÓGICO.....	26
3.1 Metodología de la Investigación.....	26
3.1.1 <i>Tipo de la Investigación</i>	26
3.1.2 <i>Enfoque de la Investigación</i>	26
3.1.3 <i>Diseño de la investigación</i>	26
3.2 Unidad de Análisis.....	27
3.3 Etapas de la investigación.....	27

3.3.1	<i>Recolección de muestras</i>	27
3.3.2	<i>Aislamiento</i>	28
3.3.3	<i>Caracterización</i>	30
3.3.4	<i>Evaluación de la tolerancia a metales pesados (Cr, Pb y Hg)</i>	30
3.3.5	<i>Identificación bioquímica</i>	33

CAPÍTULO IV:

4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
4.1	Recolección de las muestras	35
4.1.1	<i>Caracterización físico-química y biológica de los efluentes</i>	36
4.2	Aislamiento	37
4.2.1	<i>Siembra y estimación del número de UFC de las muestras</i>	37
4.2.2	<i>Selección y aislamiento de las colonias</i>	40
4.3	Caracterización macroscópica y microscópica	41
4.3.1	<i>Tinción Gram</i>	41
4.3.2	<i>Caracterización de la morfología macroscópica de los clones aislados</i>	41
4.4	Pruebas de tolerancia a metales pesados	44
4.4.3	<i>Tolerancia a cromo</i>	45
4.4.4	<i>Tolerancia a mercurio</i>	48
4.4.5	<i>Tolerancia a plomo</i>	52
4.4.6	<i>Multiresistencia a metales pesados</i>	55
4.4.7	<i>Evaluación de la capacidad de crecimiento a 10°C, 20°C y 35°C</i>	57
4.5	Identificación bacteriana	60
4.6	Evaluación de resistencia a antibióticos	62
	CONCLUSIONES	64
	RECOMENDACIONES	65

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

INDICE DE FIGURAS

Figura 2-1	Proceso productivo de cuero.....	14
Figura 4-1	Identificación de puntos de muestreo.....	35
Figura 2-2	Áreas y procesos de producción de la empresa Curtiembre Quisapincha.....	15
Figura 4-2	Bombo o ´fulón´ para curtido de pieles.....	36
Figura 2-3	Ubicación de la empresa Curtiembre Quisapincha.....	15
Figura 4-3	Promedio del número de UFC de cada muestra en los 3 medios.....	39
Figura 2-4	Efectos dérmicos de cromo hexavalente.....	17
Figura 4-4	Porcentaje de clones bacterianos Grampositivos y Gramnegativos.....	41
Figura 2-5	Técnicas de biorremediación.....	18
Figura 4-5	Porcentaje de clones bacterianos que presentan un tipo de forma.....	42
Figura 2-6	Principales mecanismos de interacción metal-microbiota.....	21
Figura 4-6	Porcentaje de clones bacterianos que presentan un tipo de borde.....	43
Figura 4-7	Porcentaje de clones bacterianos que presentan un tipo de elevación.....	43
Figura 4-8	Porcentaje de clones bacterianos que presentan diferentes colores.....	44
Figura 4-9	Desarrollo de los clones bacterianos en ensayos de tolerancia a cromo.....	45
Figura 4-10	Perfil de tolerancia de los clones en presencia de cromo.....	47
Figura 4-11	Perfil de tolerancia de los clones en presencia de mercurio.....	50
Figura 4-12	Coloración observada en los clones crecidos en presencia de Hg.....	51
Figura 4-13	Perfil de tolerancia de los clones en presencia de plomo.....	54
Figura 4-14	Coloración observada en los clones crecidos en presencia de plomo.....	55
Figura 4-15	Pruebas de temperatura en medios con metales y en PCA a las 96 horas.....	60

INDICE DE TABLAS

Tabla 2-1	Fuentes y efectos adversos para la salud de metales pesados.....	7
Tabla 3-1	Numeración e identificación de los puntos de muestreo.....	27
Tabla 4-1	Análisis físico-químicos y biológicos de las muestras de los efluentes de Curtiembre Quisapincha.....	36
Tabla 2-2	Técnicas de tratamiento para la remoción/eliminación de metales pesados.....	11
Tabla 3-2	Composición de Plate Count Agar (PCA).....	28
Tabla 4-2	Estimación del número de UFC de la muestra M1.....	38
Tabla 2-3	Mecanismos de resistencia metales pesados de microorganismos.....	20
Tabla 3-3	Concentraciones evaluadas en cada ensayo de tolerancia a metales pesados.....	31
Tabla 4-3	Estimación del número de UFC de la muestra M2.....	38
Tabla 2-4	Principales características de identificación bacteriana.....	22
Tabla 3-4	Concentraciones de Pb, Cr y Hg aplicadas.....	32
Tabla 4-4	Estimación del número de UFC de la muestra M3.....	39
Tabla 2-5	Límites de descarga al sistema de alcantarillado público.....	25
Tabla 3-5	Pruebas bioquímicas de identificación.....	33
Tabla 4-5	Identificación de las colonias seleccionadas para la caracterización.....	40
Tabla 4-6	Ensayos de tolerancia a cromo.....	45
Tabla 4-7	Ensayos de tolerancia a mercurio.....	48
Tabla 4-8	Ensayos de tolerancia a plomo.....	52
Tabla 4-9	Límite de tolerancia a Pb, Cr y Hg en clones obtenidos.....	56
Tabla 4-10	Capacidad de crecimiento a 10°C, 20°C y 35°C, en medios con metales y en medio PCA.....	57
Tabla 4-11	Resultados de la identificación bioquímica de clones finales.....	61
Tabla 4-12	Resultados de antibiogramas de clones identificados.....	62

RESUMEN

El objetivo fue aislar y caracterizar microbiota bacteriana nativa que pueda presentar resistencia a metales pesados, a partir de los efluentes de la empresa Curtiembre Quisapincha, provincia de Tungurahua. Muestras de agua residual procedentes de la empresa fueron recolectadas y utilizadas para el aislamiento de bacterias utilizando agar PCA con y sin la adición de dos tipos de presión selectiva: dicromato de potasio a 25 ppm (*medio A*) y el efluente del proceso diluido en agua destilada 1:10 (*medio B*). Se aislaron un total de 66 clones bacterianos, los cuales fueron sometidos a pruebas de resistencia a cromo, plomo y mercurio en diferentes concentraciones y temperaturas (10, 20 y 35°C). Como resultado se encontraron niveles variables de resistencia para los clones aislados, de los cuales, 3 mostraron resistencia hasta 700 ppm de mercurio, 5 hasta 2000 ppm de plomo y un clon hasta 900 ppm de cromo; todos fueron capaces de crecer a las tres temperaturas evaluadas, presentando ligeras variantes de crecimiento para las mismas. El análisis bioquímico permitió identificar los clones resistentes como microorganismos de los géneros *Micrococcus* (11%), *Enterobacter* (11%), *Moraxella* (33%), *Citrobacter* (22%), *Staphylococcus* (11%) y *Kurthia* (11%). Se concluye que bacterias extremotolerantes a metales pesados, fueron aisladas a partir de efluentes contaminados, razón por la cual los microorganismos analizados presentan características de adaptación a ambientes hostiles. Se recomienda continuar con la investigación de bacterias eficientes con el fin de profundizar los conocimientos sobre la interacción microorganismo – metal y aplicarlos en tratamientos biotecnológicos de ambientes contaminados con metales pesados.

Palabras claves: <BIOTECNOLOGÍA>, <MICROBIOLOGÍA>, <MICROBIOTA NATIVA>, <METALES PESADOS>, < AISLAMIENTO DE BACTERIAS>, <INDUSTRIA CURTIEMBRE>, <RESISTENCIA A METALES PESADOS>.

SUMMARY

The objective was to isolate and characterize native bacterial microbiota that could present resistance to heavy metals, from the effluents of Quisapincha tannery company, Tungurahua province. Samples of wastewater from the company were collected and used for the isolation of bacteria using PCA agar with and without the addition of two types of selective pressure: potassium dichromate at 25 ppm (medium A) and the effluent of the process diluted in water distilled 1:10 (medium B). A total of 66 bacterial clones were isolated, which were subjected to chrome, lead and mercury resistance tests at different concentrations and temperatures (10, 20 and 35 C). As a result, variable levels of resistance were found for the isolated clones, of which, 3 showed resistance to 700 ppm of mercury, 5 to 2000 ppm of lead and one clone to 900 ppm of chromium; all were able to grow at the three temperatures evaluated, presenting slight growth variants for them. The biochemical analysis allowed identifying the resistant clones as microorganisms of the genera *Micrococcus* (11%), *Enterobacter* (11%), *Moraxella* (33%), *Citrobacter* (22%), *Staphylococcus* (11%) and *Kurthia* (11%). It is concluded that extreme bacteria tolerant to heavy metals, were isolated from contaminated effluents, reason why the microorganisms analyzed have characteristics of adaptation to hostile environments. It is recommended to continue with the investigation of efficient bacteria in order to deepen the knowledge about the interaction of microorganism-metal and apply them in biotechnological treatments of environments contaminated with heavy metals.

Keywords <BIOTECHNOLOGY>, <MICROBIOLOGY>, <NATIVE MICROBIOTE>, <HEAVY METALS>, <INSULATION OF BACTERIA>, <INDUSTRY CURTIEMBRE>, <RESISTANCE TO HEAVY METALS>

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Identificación del problema

En la actualidad, la contaminación por metales pesados es un problema de relevancia mundial, debido a la toxicidad y la amenaza que representan para la vida humana y el ecosistema. Los niveles de metales en todos los ambientes, aire, agua y suelo, están aumentando a niveles tóxicos, por contribuciones de una gran variedad de fuentes industriales, principalmente de operaciones mineras y descarga al ambiente de desechos industriales. Los metales como el arsénico, el cadmio, el plomo, el mercurio, la plata, el cromo, etc., causan condiciones que incluyen hipofosfatemia, enfermedades cardíacas, daño hepático, cáncer, enfermedades neurológicas y cardiovasculares, daño al sistema nervioso central y alteraciones sensoriales (Pandey, S. *et al.*, 2013).

El cromo es el séptimo elemento más abundante en la tierra, sus estados de oxidación más prevalentes en el entorno natural son trivalentes y hexavalentes, siendo éste último altamente tóxico y mutagénico para los seres vivos. El cromo es liberado por una gran cantidad de operaciones industriales como la galvanoplastia, la fabricación de cromatos, tintes, pigmentos y la industria del curtido de cuero; mismas que presentan un alto impacto ambiental (Bakiyaraj, R., *et al.*, 2014, pp. 715-719).

En Ecuador, la industria del cuero es una actividad de relevancia económica, principalmente en la provincia de Tungurahua, en donde corresponde un representativo del cantón Ambato. Se estima un aproximado de 80 curtiembres en Ecuador, entre industrializadas y artesanales; sumándose a éstas 60 empresas y proveedores de materia prima y químicos asociados al sector. (Zurita, G. 2016, pp. 26 – 34).

Lamentablemente, el sector curtidor representa a la vez, una industria con altos niveles de contaminación que atenta contra la Seguridad Alimentaria y consecuentemente contra la Salud, debido a que Tungurahua es considerada una de las provincias con mayor productividad agronómica del país con alrededor de 58000 hectáreas cultivables, de las cuales 4950 hectáreas

son regadas con agua contaminada y pertenecen a 10 parroquias y comunidades de los cantones Ambato y Pelileo, donde se depositan aguas servidas y desechos de curtiembres y otras empresas, que son arrastrados por los ríos Ambato, Pachanlica y Cutuchi. Según estudios realizados por el Instituto Nacional de Riego, se afirma que el agua de estos ríos contiene cromo, coliformes fecales, hierro, permanganato de potasio, plomo, grasas, pesticidas, y otros productos que provocan cáncer en órganos como el hígado, estómago, colon y páncreas (Moreta, M., 2009).

El proceso de curtido necesita cerca de 300 kg de productos químicos por tonelada de piel, mismos que generan considerables volúmenes de aguas residuales, en un rango de 34 m³ a 56 m³ por tonelada de cuero procesado con sales de cromo (Siddiquee, *et al*, 2012, pp. 20 – 23). Los residuos líquidos de las curtiembres presentan altos niveles de DBO, DQO, sulfuros, sólidos suspendidos, y principalmente sales de cromo, puesto que del 60 al 80% de este metal es tomado por la piel (Siddiquee, *et al*, 2012, pp. 20 – 23), y el resto es descargado a sumideros y alcantarillados que desembocan en cuerpos de agua receptores.

La información sobre el efecto de los contaminantes en la comunidad microbiana del agua se considera fundamental para el desarrollo de cualquier estrategia de biorremediación sostenible para la limpieza de sitios contaminados con residuos de curtiembre; en este contexto es necesario la búsqueda y caracterización de microorganismos eficientes de ambientes hostiles, finalidad con la que se realiza la presente investigación.

1.2 Justificación de la investigación

La presencia de iones metálicos en efluentes de origen industrial posibilita la interacción de la microbiota ambiental con estos compuestos, dando origen a procesos adaptativos que se expresan como mecanismos de resistencia. Un ejemplo de esto es la industria del cuero, la cual representa un problema de importancia sanitaria y ambiental por contaminación del agua y suelos.

La biotecnología ha desarrollado técnicas eficientes y sostenibles para la reducción de la contaminación por metales pesados. La biorremediación se considera una de las tecnologías más seguras, limpias, rentables y amigables con el ambiente para descontaminación de sitios con una amplia gama de desechos tóxicos. El proceso de biorremediación utiliza diversos agentes como bacterias, hongos, algas y plantas superiores como herramientas en el tratamiento de ambientes contaminados con metales pesados, mediante procesos de biosorción y bioacumulación que

secuestran iones metálicos disueltos en soluciones complejas con alta eficiencia y rapidez (Wang & Chen, 2009).

La presente investigación está orientada a la búsqueda de microorganismos de aguas residuales de la industria del cuero, siendo Tungurahua foco centralizador de esta industria, es un área apta para investigación *in-situ* de microorganismos resistentes a metales, específicamente de bacterias extremófilas, mediante aislamiento, caracterización e identificación de las mismas; lo que permita proporcionar información valiosa acerca de características de resistencia y procesos de adaptación a metales pesados con posibles aplicaciones en procesos biotecnológicos de descontaminación.

La importancia del presente trabajo de investigación se fundamenta en ser un aporte práctico y teórico con el que se pueda profundizar en el conocimiento sobre microorganismos extremos y sus mecanismos de adaptación, para posteriores investigaciones que abarquen ramas complementarias al tema.

Además, la investigación toma en cuenta las políticas enmarcadas dentro del objetivo tercero del Plan Nacional del Buen Vivir 2017–2021, mismo que implica la reducción, prevención, control y mitigación de la contaminación ambiental; la conservación, el uso sostenible de los recursos naturales, corresponsabilidad social, el cambio de la matriz productiva basada en los principios de bio-economía y la generación de bioconocimiento. (Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo-Senplades, 2017).

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Aislar y caracterizar microbiota nativa que pueda presentar resistencia a metales pesados, a partir de efluentes procedentes de la empresa Curtiembre Quisapincha, parroquia de Quisapincha, provincia de Tungurahua.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Realizar la caracterización físico-química de muestras obtenidas de los efluentes de una industria de cuero.

- Aislar cepas bacterianas resistentes a cromo VI, a partir de las muestras del agua residual obtenidas de la empresa Curtiembre Quisapincha.
- Evaluar el nivel de resistencia de las cepas bacterianas a diferentes concentraciones de metales pesados.
- Identificar las cepas bacterianas con mayor nivel de resistencia a metales pesados, mediante pruebas bioquímicas.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la Investigación

El amplio uso industrial de los derivados de metales pesados, ha ocasionado que estos compuestos sean considerados como serios contaminantes ambientales. El fenómeno de difusión de los contaminantes a través de las capas del suelo y el cambio en la movilidad de los metales pesados en cuerpos de agua con la intrusión de contaminantes orgánicos, están siendo estudiados con mayor detalle en los últimos años en conjunto con el desarrollo de nuevas tecnologías de tratamiento para este tipo de contaminantes. (Cheung & Gu, 2007, pp. 8-15). Una de las más prometedoras e innovadoras tecnologías incluye procesos biotecnológicos con microorganismos eficientes, por lo que se han desarrollado varios estudios relacionados a este ámbito; con la finalidad de lograr un mayor conocimiento sobre algunos de los mecanismos de interacción de microorganismos nativos y exógenos con metales pesados.

Verma *et al.* (2001), realizaron un estudio sobre la presencia de microorganismos tolerantes a metales en efluentes de curtiembres; encontrando 77 aislados resistentes a niveles de cromato de hasta 200 µg/ml, además alrededor del 80% mostraron una relación de multiresistencia a metales pesados (Cr^{+6} , Cu^{+2} , Cd^{+2}) y a antibióticos (cefaloridina, estreptomicina y carbencilina).

Varias bacterias tolerantes a niveles de cromato mayores a 400 µg/ml fueron aislados de efluentes de curtiembres por Sankar *et al.* (2011). Estos aislados mostraron un grado variable de reducción de Cr^{+6} en condiciones oxidantes, 10 aislamientos fueron eficaces para reducir el 70% de Cr^{+6} en condiciones anóxicas a temperatura ambiente. Se identificaron 2 aislados de *Pseudomonas*, 3 de *Micrococcus* y 2 de *Aeromonas*. Estos aislados bacterianos se examinaron adicionalmente para determinar su tolerancia a una variedad de otros metales pesados, y resultó que además de su tolerancia a cromo, mostraron tolerancia a diferentes concentraciones de plomo, zinc y cadmio, todos los casos superiores a 200 µg/ml.

Tamil *et al.* (2012) seleccionaron un total de 50 aislamientos del efluente de una curtiduría, 5 de los 50 aislados fueron identificados como *Escherichia coli*, *Bacillus sps*, *Pseudomonas sps.*,

Flavobacterium sps. y *Alcaligenes sps.* Los aislados identificados fueron resistentes a Pb, Cu, Zn, Cr y Hg. Las múltiples resistencias metálicas de estos aislados también se asociaron con antibióticos.

En la actualidad, es posible encontrar una amplia información acerca del potencial microbiológico encaminado a tratamientos de ambientes contaminados con metales pesados, los microorganismos cuentan con capacidades metabólicas que les permiten utilizar diferentes tipos de sustratos, como por ejemplo metales pesados a los que pueden inmovilizar o transformar utilizando diversas estrategias. Con el fin de lograr cepas microbianas más eficientes se han utilizado técnicas de ingeniería genética para manipular microorganismos con buenas capacidades biorremediadoras, generando otros con capacidades potenciadas que muestran resultados prometedores en estudios *in vitro* y de campo, por otro lado, los mejores resultados se han derivado del uso en conjunto de las capacidades simbióticas entre plantas y microorganismos (Beltrán & Gómez, 2016, pp. 190).

2.2 Marco conceptual

2.2.1 Metales pesados

Metal pesado es un término colectivo general que se aplica a los grupos de metales y metaloides con densidad superior a 4000 kg.m⁻³, o 5 veces más que el agua y son componentes naturales de la corteza terrestre. Las formas más tóxicas de estos metales en sus especies iónicas son los estados de oxidación más estables, como Cd⁺², Pb⁺², Hg⁺², As⁺³, Cr⁺⁶, entre otros, los que reaccionan con las biomoléculas de los cuerpos para formar compuestos tóxicos extremadamente estables que son difíciles de disociar y que ocasionan daños irreversibles (Kulshreshtha *et al.*, 2014).

2.2.1.1 Metales pesados, fuentes y riesgos para la salud

La bioacumulación de metales pesados y la dificultad de ser metabolizados por el cuerpo humano, hace de ellos contaminantes altamente tóxicos. Su presencia en altas concentraciones causa varias deficiencias en el organismo y limita las funciones fisiológicas del cuerpo. Metales como As, Hg, Cd, Cr, Pb y Ag provienen de diferentes fuentes industriales y afectan de diferente manera a diferentes órganos como se muestra en la Tabla 2-1. (Das & Dash, 2017, pp. 7,8)

Tabla 2-1. Fuentes y efectos adversos para la salud de metales pesados.

Metal	Fuente	Industrias	Toxicidad
Arsénico (As)	Polvo industrial y agua contaminada.	<ul style="list-style-type: none"> • Fundición de metales. • Extracción de minerales. • Electrónica. • Curtiduría. • Plaguicidas. 	Pérdida de cabello, daño hepático, despigmentación, cáncer a la piel y viscerales, nefropatía, dermatosis.
Mercurio (Hg)	Humo industrial, vapor, empaste dental, consumo de pescado contaminado.	<ul style="list-style-type: none"> • Plantas de energía cloro-alcálicas. • Baterías. • Electrónica. 	Rinitis y sinusitis crónica, cáncer respiratorio, dermatitis, insomnio, pérdida de memoria, cambios neuromusculares, dolores de cabeza, y desórdenes neurológicos.
Cadmio (Cd)	Polvo y humo industrial, agua y comida contaminada, fertilizantes y baterías de Ni-Cd.	<ul style="list-style-type: none"> • Extracción de minerales • Fundición. • Aleaciones y aceros • Electrónica. • Agricultura y ganadería. 	Hipertensión, inhibe la acetilcolina, daño renal, deterioro pulmonar, anemia, disfunción de la próstata, desmineralización de los huesos, aterosclerosis, enfisema y afecta a la presión sanguínea.
Cromo (Cr)	Emisiones de polvo, humo de tabaco, corrosión metálica vertederos contaminados, efluentes de plantas químicas y de cuero.	<ul style="list-style-type: none"> • Metalúrgica. • Minería de metales ferrosos • Galvanoplastia. • Pinturas y pigmentos. • Electrónica • Agricultura y ganadería. • Curtiembres. 	Necrosis tubular aguda, enfermedad de la piel, cáncer, úlceras, cáncer respiratorio, nefritis tóxica, daño hepático, dolores de cabeza, colapso circulatorio y falla orgánica multisistémica.
Plomo (Pb)	Vapor industrial, incineración de residuos, corrosión metálica, lixiviados y efluentes industriales, residuos metálicos.	<ul style="list-style-type: none"> • Extracción de minerales. • Fundición. • Metalúrgica. • Aleaciones y acero. • Baterías • Electrónica. • Agricultura y ganadería. • Producción de pinturas y pigmentos. 	Pérdida de memoria, daño del sistema nervioso central, anemia, niveles de presión sanguínea altos, dolores de cabeza, neuropatía, encefalopatía, problemas de aprendizaje, desorden de déficit de atención y teratogenicidad cerebral.

Plata (Ag)	Subproductos de fundición, suministros fotográficos y electrónicos, combustión de carbón, revalos mineros.	<ul style="list-style-type: none"> • Extracción de minerales • Fundición. • Metalúrgica. • Aleaciones y acero. • Galvanoplastia. • Baterías. 	Problemas respiratorios, daño de los tejidos reproductivos, disturbios gastrointestinales, insuficiencia renal e irritación respiratoria.
------------	--	--	---

Fuente: (Das & Dash, 2017, pp. 7,8)

Realizado por: NAVARRETE, Vanessa. 2017

2.2.1.2 Metales pesados y ambiente

A diferencia de casi todos los contaminantes orgánicos, como los organoclorados, los metales pesados son elementos que se producen naturalmente en la corteza terrestre. Por lo tanto, se encuentran naturalmente en suelos y rocas, fondo natural en suelos, sedimentos, cuerpos de agua y organismos, no obstante, incluso los metales esenciales como el hierro, el zinc, el cobre y el manganeso son tóxicos en altas concentraciones y pueden ser dañinos para el organismo y para el ecosistema (Domènech & Peral, 2006, pp.134).

La contaminación ambiental por metales pesados ha ido en aumento las últimas décadas debido al amplio uso de estos contaminantes en las industrias, que representan sus principales fuentes de emisión a la atmósfera y vertidos en ambientes terrestres y acuáticos, provocando la alteración de estos ecosistemas y sus componentes (Caviedes, *et al.*, 2015, pp. 74).

Aire

La contaminación atmosférica es causada principalmente por la combustión de productos de petróleo o carbón, incluidos la combustión de madera o desechos agrícolas; por vehículos y por industrias y centrales eléctricas. Otra de las principales fuentes son los procesos industriales que involucran la formación de polvo, como en fábricas de cemento y fundiciones de metal. Los metales pesados como el cadmio, el plomo y el mercurio son contaminantes comunes del aire y se emiten principalmente como resultado de diversas actividades industriales. Aunque los niveles atmosféricos de metales pesados son bajos, contribuyen a la deposición y la acumulación en los suelos, ya que son persistentes en el ambiente y están sujetos a la bioacumulación en las cadenas alimenticias. (Hassanien, 2011, pp.287, 288).

Suelo

La contaminación por metales pesados en el suelo es uno de los principales problemas ambientales en muchos países ya que estos contaminantes provienen de diversas fuentes, los niveles elevados de metales pesados no solo disminuyen la actividad microbiana del suelo y la producción de cultivos, sino que también amenazan la salud humana a través de la cadena alimentaria. Se pueden encontrar niveles extremadamente altos de contaminantes en el suelo en muchos sitios industriales y vertederos desechables, resultantes de derrames accidentales de contaminantes altamente concentrados como los metales pesados. Y así, los metales se depositan en la matriz del suelo y una vez incorporados a él, permanecen durante un período de tiempo muy largo (Ansari, R. *et al.*, 2015).

Agua

Los metales pesados ocurren en la corteza terrestre y pueden solubilizarse en el agua subterránea a través de procesos naturales o por cambios en el pH del suelo. Sin embargo, el agua subterránea y el agua superficial pueden contaminarse con metales pesados por lixiviados de vertederos y relaves mineros, aguas residuales, eliminación profunda de desechos líquidos, filtraciones de lagunas de residuos industriales o de derrames, fugas industriales, o incluso por la lluvia ácida que descompone los suelos y libera metales pesados en arroyos, lagos, ríos y aguas subterráneas. Aproximadamente 10^9 Kg/año de trazas de metales se han vertido en diferentes cuerpos de agua y entre las principales fuentes de emisión se encuentran las aguas residuales de origen industrial y doméstico, las fundiciones, las plantas térmicas, y eléctricas (Verma & Pratima, 2013, pp.98-99).

2.2.1.2.1 Estado global de la toxicidad de los principales metales pesados

Mercurio (Hg)

El mercurio es un metal tóxico naturalmente presente en el ambiente. Se presenta como un contaminante global ya que puede ser transportado a largas distancias y es bioacumulable. Es el único metal líquido a temperatura ambiente, de color plateado y se considera una potente neurotoxina, ocupando el tercer lugar del ranking de los elementos más tóxicos del planeta, después del arsénico y el plomo (Organización Mundial de la Salud, 2016).

Se produce de forma natural como HgS insoluble o como complejo inorgánico soluble de Hg^{+2} , Hg^{+1} , o $(Hg_2)^{+2}$ generados por procesos microbianos y antropogénicos. Afecta principalmente al ambiente marino; al ser consumido por microorganismos, el mercurio es transformado a

metilmercurio, introduciéndose en la cadena alimenticia del mar hasta llegar a los humanos. (Das & Dash, 2017, pp. 10)

Plomo (Pb)

El plomo se encuentra en el ambiente en combinación con otros elementos formando minerales. Es un metal bioacumulable, de alta toxicidad y persistencia en el ambiente. La OMS lo ubica en la lista de los diez productos químicos más tóxicos para las plantas y animales. Debido a que el plomo es un elemento traza esencial, la OMS ha establecido límites máximos para niveles de plomo en la sangre que son 1,9 $\mu\text{mol/L}$ para hombres y 1,4 $\mu\text{mol/L}$ para mujeres. (Das & Dash, 2017, pp. 10)

Cadmio (Cd)

El cadmio es un metal tóxico no esencial, es introducido al ambiente por erupciones volcánicas, erosión, meteorización, transporte fluvial y actividades antropogénicas. Su toxicidad está asociada con la absorción por cultivos, acumulación en tejidos animales y bioacumulación a través de la cadena alimenticia. Es altamente persistente en humanos, con una vida media biológica de 20 – 30 años, y es clasificado como cancerígeno (Das & Dash, 2017, pp. 7).

Arsénico (As)

El arsénico es un metal carcinógeno bien conocido, difundido en el ambiente, que afecta alrededor de 150 millones de personas. Este elemento tiene un carácter iónico que forma compuestos catiónicos y aniónicos, sus estados de oxidación más estables son As^{-3} , As^0 , As^{+3} y As^{+5} ; entre estos, las formas inorgánicas As^{+3} y As^{+5} son los más comunes y las más tóxicas, al igual que persistentes. Generalmente, altos niveles de As, han sido encontradas en aguas subterráneas debido a la contaminación antropogénica y la derivada de fuentes naturales, una de ellas debido a la roca local geológica natural. (Das & Dash, 2017, pp. 6).

Cromo (Cr)

Es uno de los mayores contaminantes ambientales. Existe en dos formas: Cr^{+3} y Cr^{+6} , esta última es considerada la más toxica debido a su alta solubilidad, movilidad, estabilidad y rápida permeabilidad. Existe naturalmente como cromito (FeOCr_2O_3), mineral extensamente distribuido en aire, agua, suelo y comida. Naturalmente, entra en el agua y suelo por erosión y erupciones volcánicas. Por otro lado, es importante indicar que la industria del cuero muy común en países del tercer mundo libera al ambiente importantes cantidades de Cr. (Das & Dash, 2017, pp. 9)

2.2.1.3 Tratamientos para la remoción de metales pesados en medios hídricos

En la actualidad encontramos una serie de técnicas convencionales y no convencionales para el tratamiento de ambientes contaminados con metales pesados (Tabla 2-2), sin embargo, varios desafíos han llevado a una implementación de campo limitada de estas técnicas; desafíos técnicos como el riesgo de exposición al área contaminada, costo del tratamiento, parámetros ambientales complejos y la necesidad de acidificación para inducir la desorción, lo que limita su aplicación en diferentes ambientes, siendo el objetivo final en cualquier proyecto de remediación el devolver el sitio a su condición de precontaminación, que a menudo incluye revegetación para estabilizar el suelo tratado, muchas de estas técnicas no logran llenar estas expectativas (Das & Dash, 2017, pp. 14).

Tabla 2-2. Técnicas de tratamiento para la remoción/eliminación de metales pesados.

Técnicas de tratamiento		Argumento	Condiciones de trabajo
CONVENCIONALES	<u>Filtración por membranas</u>	Electrodialisis	Remoción de iones contaminantes (de 0,0001 μm) mediante membranas permeables selectivas o láminas de resinas de intercambio iónico, en un campo eléctrico constante. <i>Temperatura:</i> 25°C <i>pH:</i> 3-8 (depende del metal) <i>Tiempo de tratamiento:</i> 2-24 horas (depende del metal).
		Osmosis Inversa	Proceso de separación por difusión controlada o cribado a través de membrana permeables selectivas para elementos de 0.0001mm. <i>Temperatura:</i> 12 - 24°C (depende del metal). <i>pH:</i> 6-9 (depende del metal) <i>Tiempo de tratamiento:</i> 4 h.
		Nanofiltración	Utiliza membranas porosas con diámetros menores a 1nm, capaces de retener iones neutros con mayor rechazo de especies divalentes y menor rechazo de especies monovalentes. <i>Temperatura:</i> 20 - 25°C (depende del metal). <i>pH:</i> 2-11 (depende del metal) <i>Tiempo de tratamiento:</i> 4-36 horas (depende del metal). <i>Presión:</i> 10-50 bar.
		Ultrafiltración	Fraccionamiento selectivo de sólidos en suspensión y solutos de alto peso molecular. <i>Temperatura:</i> 5 - 45°C (depende del metal). <i>pH:</i> 2-13 (depende del metal) <i>Tiempo de tratamiento:</i> 2,5 h. <i>Presión:</i> hasta 10 bares.

	<u>Intercambio Iónico</u>	Proceso de separación física de iones en solución transfiriéndolos a una matriz sólida, sin modificaciones químicas. Menor producción de lodos.	<i>Temperatura:</i> 25 y 26°C (depende del metal). <i>pH:</i> 3-6 (depende del metal) <i>Tiempo de tratamiento:</i> 4-24 horas (depende del metal).
	<u>Adsorción (Carbón activado)</u>	Remoción por adsorción de contaminantes inorgánicos y orgánicos gracias a su área superficial porosa que va desde 500 hasta 1.500 m ² /g.	<i>Temperatura:</i> 20 y 40°C (depende del metal). <i>pH:</i> 4-8 (depende del metal) <i>Tiempo de tratamiento:</i> 6-24 horas (depende del metal).
	<u>Precipitación química</u>	Técnica para remover contaminantes por precipitación de sustancias químicas como hidróxidos, eliminándolos por floculación y sedimentación. Alta generación de lodos.	<i>Temperatura:</i> Ambiente. <i>pH:</i> 1-12 (depende del metal) <i>Tiempo de tratamiento:</i> 1 h como máximo.
	<u>Coagulación-Floculación</u>	Procesos en el que se desestabiliza el coloide y posteriormente aglomerarlo mediante la atracción de partículas por acción de los floculantes.	<i>Temperatura:</i> Ambiente. <i>pH:</i> 7-9 (depende del metal) <i>Tiempo de tratamiento:</i> 2-30 min.
NO CONVENCIONALES	<u>Biopolímeros</u>	Presentan capacidad de reducción y absorción de iones metálicos de transición, son ambientalmente seguros y ampliamente disponibles. Entre estos encontramos grupos hidroxilos y aminas.	<i>Temperatura:</i> 20 – 30 °C (depende del metal). <i>pH:</i> 2-8 (depende del metal) <i>Tiempo de tratamiento:</i> 30 min – 10 horas.
	<u>Hidrogeles</u>	Son polímeros hidrófilos reticulados ampliamente utilizados en la purificación de aguas residuales gracias a su alta capacidad expansión en el agua.	<i>Temperatura:</i> 22 °C <i>pH:</i> 4-7 (depende del metal) <i>Tiempo de tratamiento:</i> 24 horas -3 días.
	<u>Ceniza Volante</u>	Subproducto de la combustión de carbón en procesos de producción de energía. Es utilizado para la eliminación de gases de combustión, compuestos orgánicos y metales pesados por su capacidad de adsorción	<i>Temperatura:</i> Ambiente – 30°C (depende del metal). <i>pH:</i> 2-5 (depende del metal) <i>Tiempo de tratamiento:</i> 1 hora – 3 días.

		mediante activación química y física	
	<u>Adsorción de metales pesados por materiales naturales agrícolas e industriales</u>	Eliminación o adsorción de metales pesados mediante materiales agroindustriales como cascarilla de arroz, residuos industriales de celulosa y papel (lodo de cal y cenizas de caldera), vermiculitas, entre otros.	<i>Temperatura:</i> Ambiente. <i>pH:</i> 4-7 (depende del metal) <i>Tiempo de tratamiento:</i> 45 min – 2 horas.

Fuente: CAVIEDES *et al.*, 2015, pp. 75-85.

Realizado por: NAVARRETE, Vanessa. 2017

2.2.2 La Industria del Cuero

La industria del cuero, mejor conocida como industria del curtido, curtiembre o tenería es el lugar donde se procesan pieles en bruto, en particular de ganado vacuno, ovejas, cerdos y cabras, generalmente utilizados para fabricar cuero. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (2001), la producción mundial total de cuero es de aproximadamente $1,67 \times 10^9$ m² (Thanikaivelan, *et al.*, 2005).

Los procesos de fabricación del cuero implican la conversión de pieles biodegradables putrescibles en cuero no putrescible, para lo cual se requieren una serie de procesos físicos químicos, mismos que varían según las propiedades requeridas en los productos finales. En general, el proceso incluye la extracción del pelo de la piel, el curtido con agentes de curtiembre que conceden propiedades físicas al cuero, tintura y engrase de la piel para el acabado del cuero (Figura 2-1), lo que proporciona buen aspecto y una textura de calidad del producto que se ofrezca. (Lama, A., 2010, pp. 9, 10).

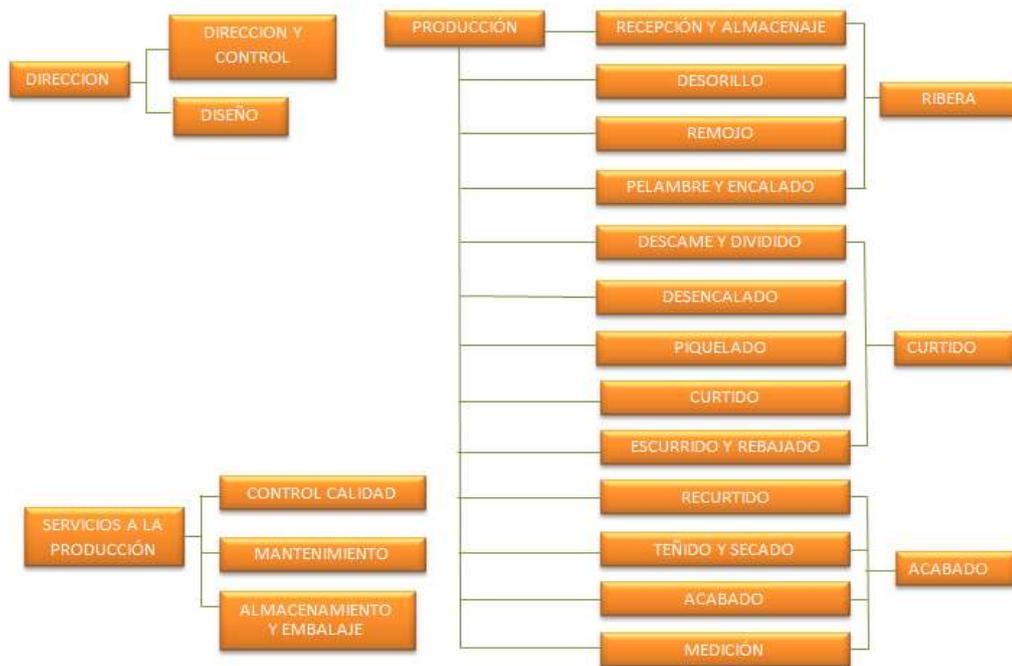


Figura 2-1. Proceso productivo de cuero.

Fuente: LAMA, A., 2010, pp. 9, 10

2.2.2.1 La Industria del Cuero en el Ecuador

Una de las industrias más representativas del Ecuador es el sector Industrial del Cuero, con un incremento en la producción del 8,6% los últimos años. Verónica Sión, ministra de Industrias y Productividad, informa de una concentración de la capacidad productiva de los curtidores en la provincia de Tungurahua, con un 76% del total entre 2011 y 2012, según lo reconoció en la Sesión Solemne de la Asociación Nacional de Curtidores del Ecuador (ANCE). Myriam Fonseca, directora ejecutiva del ANCE revela que en Tungurahua se procesa el 86% de la producción de cuero del Ecuador, específicamente en las parroquias de Píllaro, Quisapincha, Picaihua. (Ministerio de Industrias y Productividad, 2013, DCS - B092).

2.2.2.2 Empresa 'Curtiembre Quisapincha'

La empresa Curtiembre Quisapincha, se especializa en producción y comercialización de cuero: vestimenta y calzado, su personal está conformado por 28 personas, distribuidas en distintas áreas de producción de la empresa, las cuales se muestran en la Figura 2-2. (Camacho, D., 2013, pp. 73).

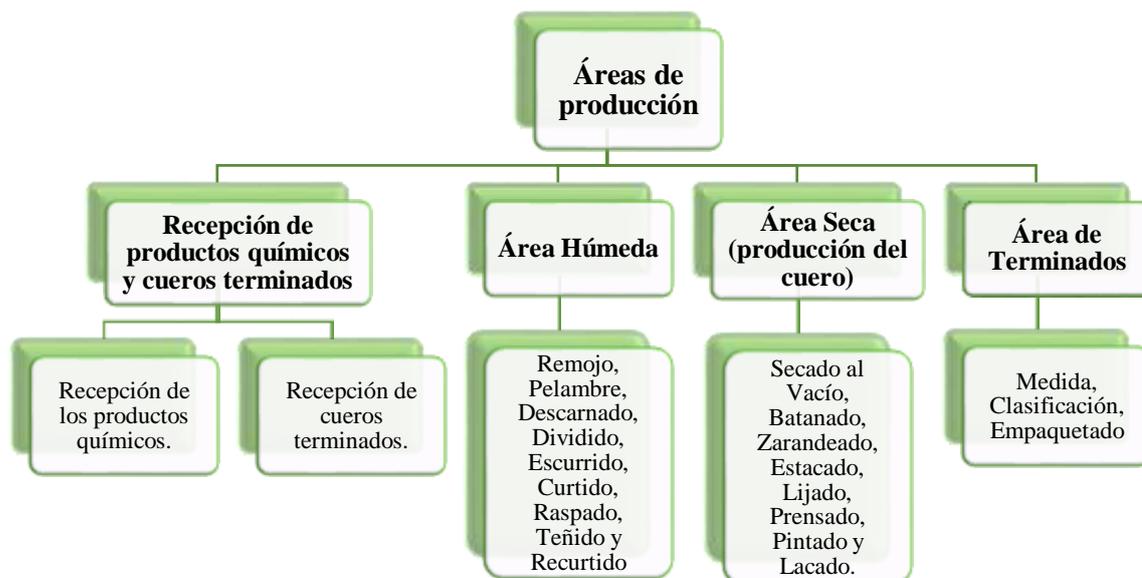


Figura 2-2 Áreas y procesos de producción de la empresa Curtiembre Quisapincha.

Fuente: CAMACHO, D., 2013, pp. 73.

Realizado por: Vanessa Navarrete

Ubicación de la empresa

- Dirección: Av. Circunvalación Alonso Palacios
- Sector: Barrio Turuloma
- Parroquia: Camilo Ponce Enríquez
- Cantón: Ambato
- Provincia: Tungurahua

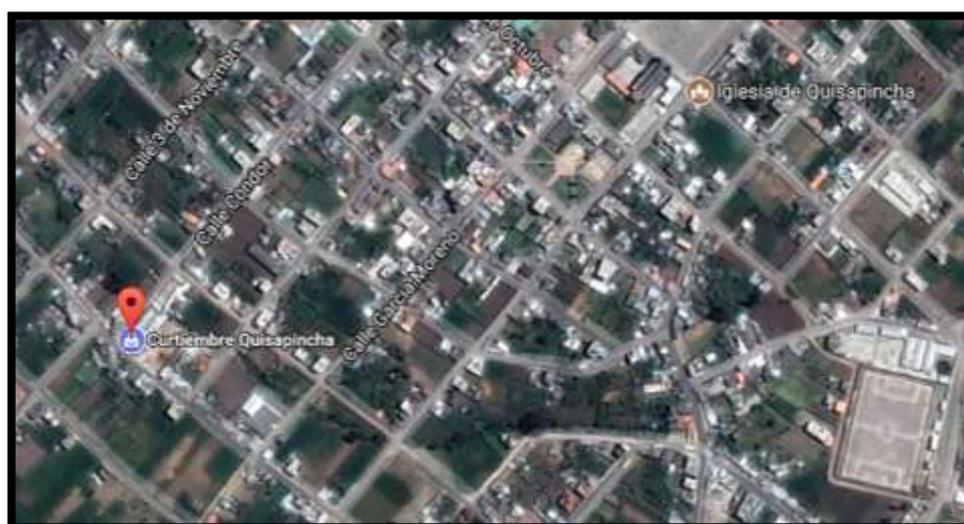


Figura 2-3 Ubicación de la empresa Curtiembre Quisapincha.

Fuente: Google Maps, 2017.

2.2.2.3 *Impacto ambiental de la industria del cuero*

Se sabe que la industria del curtido es altamente contaminante, especialmente a través de efluentes con alto contenido de sólidos disueltos y suspendidos, residuos orgánicos e inorgánicos, junto a una alta demanda de oxígeno los cuales contienen residuos de sales metálicas potencialmente tóxicas. El efluente líquido del procesamiento de cuero contiene materia orgánica, cromo, sulfuro y desechos sólidos que incluyen descarnado, recortes y limaduras, pulido de polvo, etc. (Srivastav, 2012, pp. 10).

Una gran parte de los químicos utilizados en el procesamiento del cuero no son totalmente absorbidos y son descargados al ambiente. En el curtido al cromo, del 30 - 40% de cromo es perdido y eliminado con los efluentes debido a que las pieles sólo logran absorber de un 60 – 70% de cromo. (Benítez-Campo, 2011, pp. 28)

Según CNPML (2004) citado por Benítez-Campo (2011, pp. 27), por cada 1000 Kg de piel salada que ingresa al proceso se utilizan 450 Kg de insumos químicos; como resultado se obtienen 200 Kg de cuero acabado, 640 Kg de residuos sólidos, 40 Kg de solventes son emitidos a la atmosfera y 138 Kg de agua que pierde la piel.

2.2.2.3.1 *Cromo e inconvenientes asociados a la industria de la curtiduría*

El cromo es un elemento que se presenta en dos formas como Cr^{+3} , muy estable y poco soluble el cual puede encontrarse en los cuerpos de agua como microelemento esencial; y como Cr^{+6} , con mayor movilidad, solubilidad y baja estabilidad. El cromo en su forma hexavalente es mutagénico y carcinogénico en humanos, al mismo tiempo puede alterar el equilibrio biológico seriamente causando efectos tóxicos, debido a su rápida absorción por las membranas biológicas además de la vía digestiva, respiratoria y cutánea (Benítez-Campo, 2011, pp. 27).

Alrededor del 10% Cr^{+6} que ingresa al organismo es absorbido por el sistema gastrointestinal, pudiendo provocar un colapso cardiocirculatorio que ocasiona la muerte del paciente; en caso de que sobreviva, es posible que presente insuficiencia renal aguda. La vía de absorción de más fácil acceso es la cutánea, desarrollando un cuadro patológico de dermatitis alérgica de contacto y úlceras en la piel como se observa en la Figura 2-4.



Figura 2-4. Efectos dérmicos de cromo hexavalente.

Fuente: SRIVASTAV, 2012, pp. 11

2.2.2.3.2 Tecnologías para remoción de Cromo

Entre las principales tecnologías de remoción de cromo encontramos: Precipitación con hidróxido de sodio, hidróxido de calcio y urea; Remoción por materiales absorbentes, membranas y biomateriales; Electrocoagulación y procesos Biotecnológicos con microorganismos y plantas. Un ejemplo destacado dentro de estas tecnologías convencionales es mediante la oxidación de Cr^{+6} a Cr^{+3} logrando la fijación de este en una columna de intercambio iónico utilizando una resina básica o alúmina activada como intercambiador aniónico o catiónico (Chávez, A., 2010, pp. 45-48).

En la Tabla 2-2, del apartado 2.2.1.3, se detallan los tratamientos más utilizados para la remoción de metales pesados en medios hídricos, tanto convencionales como no convencionales.

2.2.3 **Biorremediación**

La biorremediación es una estrategia sostenible que utiliza el potencial metabólico de los microorganismos (Microremediación) y las plantas (Fitoremediación) para limpiar ambientes contaminados; logrando la descomposición o inmovilización de contaminantes a través de la explotación del potencial metabólico existente en los microorganismos mediante la introducción de genes que codifican dichas funciones. La biorremediación es un medio ecológico rentable para curar la naturaleza con la naturaleza. Esta tecnología puede aplicarse en la eliminación de compuestos xenobióticos de industrias agroquímicas y petroquímicas, derrames de petróleo, metales pesados en aguas residuales, sedimentos, etc. (Sanjeev, *et al.*, pp. 11-12).

La biorremediación tiene un enfoque multidisciplinario, sin embargo, de manera simplificada se la puede dividir en dos categorías: biorremediación *in situ* y *ex situ* (Figura 2-5). El aspecto con

mayor relevancia para tratamientos de metales pesados es la aplicación de técnicas que involucren herramientas microbiológicas, dentro de las cuales es posible nombrar a bioestimulación, bioaumentación, bioacumulación y biosorción; técnicas que se han desarrollado para aplicación de biorremediación *in situ* ya que mediante estos procedimientos es posible realizar un tratamiento óptimo sin la necesidad de movilizar el sustrato contaminado fuera de su ambiente, con mayores facilidades y menores costos. (Sanjeev, *et al.*, pp. 11)

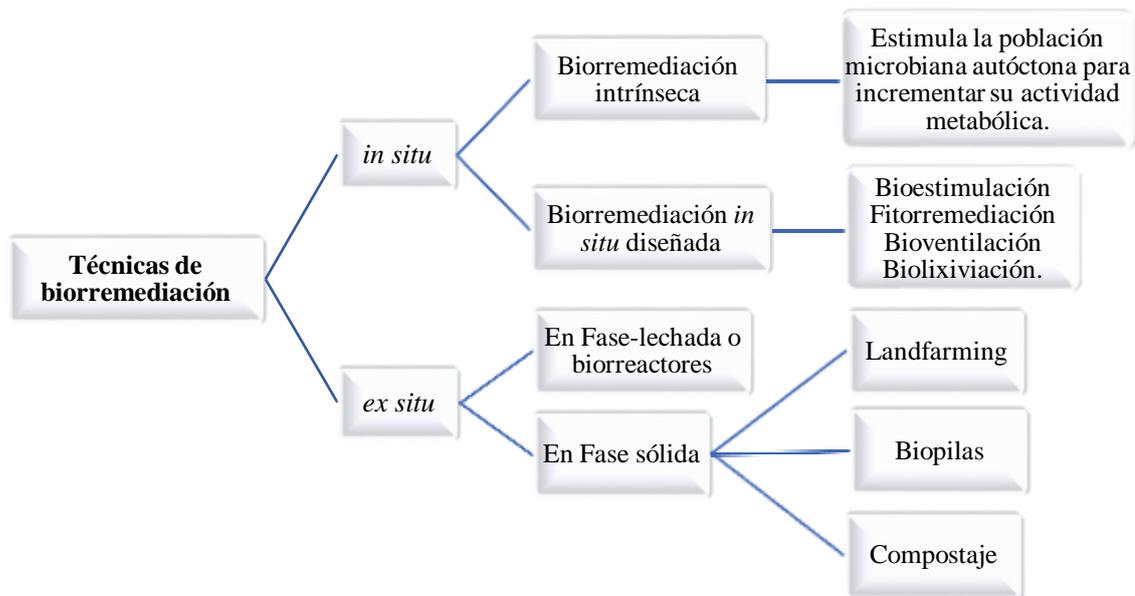


Figura 2-5 Técnicas de biorremediación.

Fuente: Kulshreshthal, *et al.*, 2014, pp. 45-48.

Otro de los métodos más aceptables y económicos para el tratamiento de lodos cloacales, desechos sólidos municipales, residuos de curtiduría, etc, es la biorremediación por compost o compostaje; la cual se refiere al uso de un sistema biológico con microorganismos en un compost curado y maduro para secuestrar o degradar contaminantes en el agua o el suelo. La biorremediación por compost ha demostrado ser efectiva en la degradación o alteración de muchos tipos de contaminantes, como los hidrocarburos clorados y no clorados, los productos químicos conservantes de la madera, los solventes, los metales pesados, los pesticidas, los productos derivados del petróleo y explosivos. El compostaje reduce los niveles de contaminantes y además, facilita el crecimiento de las plantas al proporcionar un acondicionamiento del suelo y nutrientes a una gran variedad de vegetación (Singh & Kalamdhad, 2012).

2.2.3.1 *Microorganismos y Biorremediación*

Los microorganismos juegan un papel importante en el equilibrio biológico de la vida en nuestro planeta. Aquellos con potencial de biodegradación se identifican como miembros activos de consorcios microbianos eficientes. Estos microorganismos incluyen: *Xanthofacter*, *Penicillium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Mycrobacterium*, *Nitrosomonas*, *Enterobacter*, entre otros (Beltrán & Gómez, 2016, pp. 174).

Los microorganismos pueden aislarse de casi todos los tipos de condiciones ambientales, presentando una amplia gama de adaptabilidad, como sucede en el caso de bacterias que han desarrollado diversos mecanismos para sobrevivir bajo condiciones de estrés metálico. Estos mecanismos de eliminación de metales pesados incluyen el flujo de salida de iones metálicos, acumulación y formación de complejos con los iones metálicos dentro de la célula con su posterior reducción a un estado menos tóxico o no tóxico (Kulshreshthal, *et al.*, 2014, pp. 45-48).

2.2.3.2 *Interacción Metal-Microorganismo*

A lo largo del tiempo, los microorganismos han logrado una eficiente adaptación a ambientes extremos, gracias a propiedades inherentes en ellos y en gran parte al desarrollo de diferentes mecanismos de resistencia por exposición a sustancias tóxicas presentes en ambientes como por ejemplo metales pesados. (Das & Dash, 2017, pp. 7,8)

Se han identificado numerosas formas de transformaciones de metales mediadas por microbios, muchas de las cuales pueden inmovilizar o movilizar metales en el ambiente. En algunos casos, estos procesos incluyen rutas bioquímicas altamente específicas que han evolucionado para proteger a la célula microbiana de los efectos tóxicos de metales pesados. La transformación microbiana de los metales a menudo es el resultado de mecanismos de resistencia del metal que incluyen mecanismos de secuestro, complejación, precipitación, biosorción, inmovilización, bioacumulación, así como mecanismos de solubilización que ofrecen estrategias de biorremediación (Sanjeev, *et al.*, pp. 25). Los principales tipos de interacción se resumen en la Tabla 2-3 los cuales son representados en la Figura 2-6.

Tabla 2-3. Mecanismos de resistencia a metales pesados en microorganismos.

Mecanismos generales	Mecanismos desarrollados	Elementos involucrados	Aplicación en metales
2. y 5. <i>Biosorción por complejación</i> (Figura 2-6)	Mediante: - Fuerzas de Van der Waals - Interacciones electrostáticas - Interacciones redox - Unión covalente - Precipitación extracelular o intracelular - Formación de complejos	<ul style="list-style-type: none"> • Exopolímeros (EPS) • Peptidoglicanos, • Grupos fosforilo, carboxilo e hidroxil de la pared celular bacteriana. 	U, Cu, Zn, Pb, Ni, Ag, Hg, Mn, Au, Sn, Cs. - Acomplejamiento superficial y microprecipitación de Cd^{+2} y Cr^{+3} .
3. <i>Bioacumulación</i> (Figura 2-6)	- Sistema de transporte de membrana que internaliza el metal al citoplasma. - Secuestro del metal por proteínas ricas en grupos sulfhidrilos.	<ul style="list-style-type: none"> • H⁺-ATPasa • Fosfatos, lípidos, metalotioneinas y fitoquelatinas del citoplasma celular 	Pb, Ni, Ag, Hg, Mn, Au, Sn.
4. <i>Transformación de la valencia del metal</i> (Figura 2-6)	- Movilización del metal (lixiviación) - Inmovilización del metal (proceso 1 en Figura 2-6) - Oxidación enzimática	<ul style="list-style-type: none"> • Enzimas redox especiales: catalasa, peroxidasa, lipoxigenasa, glutatión y ascorbato oxidasa 	Reducción de: - U^{+6} a U^{+4} - Cr^{+6} a Cr^{+3} (enzima cromato reductasa) - CH_3Hg^+ (metilmercurio) a Hg^{+2} (proteína liasa organomercurial: <i>merB</i>)
5. <i>Biometilación y mecanismo de volatilización</i> (Figura 2-6)	- Transformación del metal a derivados metilados con su posterior volatilización	<ul style="list-style-type: none"> • Fracciones de bajo peso molecular de ácidos fúlvicos, • Grupos metil • Proteínas y plásmidos especiales 	- Reducción de Hg^{+2} a Hg^0 gracias a la enzima citoplásmica mercurio reductasa (<i>merA</i>).
6. <i>Eflujo o flujo de salida</i> (Figura 2-6)	- Transporte activo (bomba de ATPasa) - Difusión (bomba de protones/iones quimiosmóticos)	<ul style="list-style-type: none"> • Plásmidos • ATPasas • Bombas quimiosmóticas de iones/protones 	Ar, Cr y Cd
<i>Precipitación</i> (Figura 2-6)	- <u>Intracelular:</u> Reducción de iones metálicos en el citosol por compartimentación o	<ul style="list-style-type: none"> • Síntesis de ligandos • Unión y secuestro de metales por proteínas (metalotioneínas). 	U, Cu, Zn, Pb, Ni, Ag, Hg, Mn, Au, Sn, Cs.

	para la quelación intracelular.		
	- <u>Extracelular:</u> Secreción de productos metabólicos inorgánicos para precipitar iones metálicos tóxicos o inmovilizarlos.	Sustancias ligadoras: • Ácidos orgánicos simples, Alcoholes, Polisacáridos, ácidos húmicos y fúlvicos • Grupos carboxil del peptidoglicano (en Gram positivas) • Grupo fosfato (en Gram negativas) • Sideróforos • Biosurfactantes	- Bioprecipitación de bacterias reductoras de sulfato - Cr y Cd

Fuente: (Beltrán & Gómez, 2016, pp. 175-178), (Sanjeev, *et al.*, pp. 27-34)

Realizado por: NAVARRETE, Vanessa. 2017

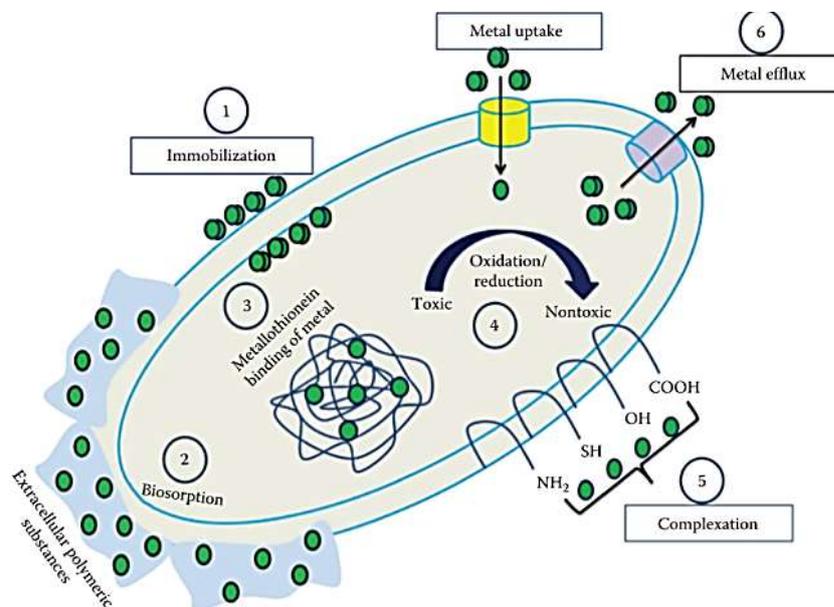


Figura 2-6. Principales mecanismos de interacción metal-microbiota.

Fuente: Das & Dash, 2017, pp. 17

2.2.4 Técnicas de análisis microbiológico

Son utilizadas para revelar, cuantificar, obtener cultivos puros e identificar las diferentes especies de microorganismos que es posible encontrar en una muestra ambiental o clínica.

Como técnica inicial se emplea la inoculación de las muestras obtenidas en medios de cultivo enriquecidos con componentes específicos que proporcionan las condiciones de vida adecuadas

y cubren los requerimientos de la población bacteriana que se va a estudiar. (Hernández, 2003, pp. 356).

2.2.4.1 *Aislamiento de bacterias*

El aislamiento de bacterias es una técnica que se vale de diferentes métodos para obtener un cultivo puro de microorganismos procedentes de una misma muestra. La técnica de obtención de un cultivo puro que se usa comúnmente con resultados satisfactorios son los métodos de siembra en placa en donde es posible realizar una transferencia de las colonias obtenidas, a otros medios en secuencia hasta obtener una mayor pureza. Entre los principales métodos de siembra en placa encontramos (Roger & Stanier, 1992, pp. 8,9):

- Siembra por estrías
- Vertido en placa
- Diseminación en superficie
- Diluciones seriadas con posterior siembra en placa

2.2.4.2 *Identificación morfológica y bioquímica*

La identificación microbiológica concibe un esquema de clasificación, determinado por una lista de características específicas y un método de comparación basado en diferentes criterios como la morfología que presentan las colonias, composición de la pared mediante tinción diferencial, requerimientos de oxígeno y pruebas bioquímicas establecidas para los diversos grupos de microorganismos conocidos caracterizados con anterioridad, pese a que los científicos estiman que se ha descubierto sólo el 1% de los microorganismos del planeta (Tortora, *et al.*, 2007, pp. 292 - 297). La Tabla 2-4 resume las principales tipologías utilizadas para la identificación bacteriana.

Tabla 2-4. Principales características de identificación bacteriana.

Tipos	Características	Fundamento / Detalle	
Caracterización macroscópica	<i>Morfología de la colonia</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Forma (Puntiforme, filamentosa, circular, fusiforme) - Borde (Ondulado, redondeado, filamentoso, rizoide) - Superficie (Lisa/Rugosa, Mate/Brillante, Seca/Creмоса, Invasiva/Superficial) - Elevación (Plana, Convexa, Umbiculada, Elevada) 	
Caracterización microscópica	<i>Morfología de las células</i>	Coco	<ul style="list-style-type: none"> - Coco - Diplococo - Estafilococo

Pruebas Bioquímicas			- Estreptococo
		Bacilos	- Bacilo - Diplobacilo - Cocobacilo - Estreptobacilo
		Vibrios	
		Espirilos	
	<i>Tinción diferencial</i>	Tinción Gram	Gram positivos Gram negativos
		Ziehl Neelsen	Propiedades ácido alcohol resistentes.
	<i>Oxidasa</i>	Presencia de citocromo oxidasa.	- Tiras reactivas impregnadas con oxidasa y reactivo de Barry. - Cultivo de medio nutritivo y reactivo de Kovacs
	<i>Catalasa</i>	Presencia de la enzima <i>catalasa</i> .	Peróxido de hidrogeno al 3 o 30 %.
	<i>Citrato</i>	Capacidad de usar el citrato como fuente de carbono.	Medio Citrato de Simmons
	<i>H₂S / Indol</i>	Degradación de tiosulfato con producción de H ₂ S y degradación de triptófano con producción de Indol	Medio SIM (Sulfhídrico Indol Movilidad)
<i>Reacción a la ureasa</i>	Capacidad de hidrolizar la urea por acción de la <i>ureasa</i> .	- Agar Base para urea y Urea al 40% - Caldo urea - Agar urea de Cristensen.	
<i>Fermentación de carbohidratos</i>	Fermentación de glucosa, lactosa, sacarosa.	-Agar Hierro Triple Azúcar (TSI) -Agar Hierro de Kligler (KIA)	
<i>Hidrolisis de almidón</i>	Presencia de la enzima: <i>Amilasa</i> (exoenzima)	Agar Almidón Revelador: Lugol.	
<i>Oxidación / Fermentación</i>	Uso de carbohidratos por procesos metabólicos, que pueden ser fermentativo u oxidativo.	Hugh and Leifson Indicador: Azul de bromotimol u otro indicador ácido/base	
<i>Licuefacción de la gelatina</i>	Capacidad de hidrolizar la gelatina mediante la enzima <i>gelatinasa</i> (Proteasa, exoenzima).	Gelatina Nutritiva	
<i>Fermentación de Manitol</i>	Fermentación de manitol y crecimiento en un medio de alta concentración salina.	Agar Manitol Salado	

	<i>Coagulasa</i>	Coagulación de plasma por acción de la <i>coagulasa</i> .	Plasma humano, estéril fresco
	<i>Rojo de metilo / Voges Proskauer</i>	Fermentación ácido mixta/ Fermentación butanodiólica	Caldo RM/VP Reveladores: Solución de Rojo de Metilo, Alfa Naftol y KOH 40%.
	<i>Nitrato reductasa</i>	Reducción de nitratos.	Caldo nitratos Revelador: Reactivos de Griess.
	<i>Descarboxilasas</i>	Presencia de descarboxilasas. Útil para diferenciar enterobacterias	Medio base de descarboxilasas u otros medios como LIA o MIO.

Fuente: (MacFaddin, F., 2003.), (Tortora, *et al.*, 2007, pp. 292 - 297)

Realizado por: NAVARRETE, Vanessa. 2017

2.2.5 Legislación

2.2.5.1 Plan nacional del buen vivir

El presente proyecto propone como uno de sus enfoques principales a los elementos enmarcados en el Objetivo 3 del Plan Nacional del Buen Vivir: "Garantizar los derechos de la naturaleza para las actuales y futuras generaciones".

Dentro de este objetivo se propone el reconocimiento de los derechos de la naturaleza, implicando el respeto integral de su existencia, el mantenimiento y regeneración de sus ciclos vitales y, la restauración de la misma en caso de degradación o contaminación. Para lograr un cumplimiento total de estos principios se establece una serie de políticas dentro de este margen, las cuales se resumen en reducción, prevención, control y mitigación de la contaminación ambiental; conservación, uso sostenible de los recursos naturales, corresponsabilidad social, cambio de la matriz productiva basada en los principios de bio-economía y la generación de bioconocimiento (Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo-Senplades, 2017).

2.2.5.2 Ley orgánica de recursos hídricos, usos y aprovechamiento del agua

Es este contexto, se hace énfasis en el apartado de DERECHOS DE LA NATURALEZA, Capítulo III de la Ley orgánica de recursos hídricos, usos y aprovechamiento del agua; acogiendo los lineamientos acordados en los Artículos 64, 65 y 66, los cuales abarcan reglamentos de Conservación, Gestión integrada y Restauración y recuperación del agua, respectivamente. (Registro Oficial - Segundo Suplemento, 2014, pp. 16)

2.2.5.2.1 Límites de descarga al sistema de alcantarillado público

En el Acuerdo Ministerial 028, Quito, viernes 13 de febrero de 2015, se realizó la actualización del Libro VI del TULSMA, en el cual consta la Tabla 9 del Anexo 1 donde se establecen los siguientes límites de descarga al sistema de alcantarillado público (Tabla 2-5):

Tabla 2-5. Límites de descarga al sistema de alcantarillado público.

TABLA 9. Límites de descarga al sistema de alcantarillado público

Parámetros	Expresado como	Unidad	Límite máximo permisible
Aceites y grasas	Solubles en hexano	mg/l	70,0
Explosivos o inflamables.	Sustancias	mg/l	Cero
Alkil mercurio		mg/l	No detectable
Aluminio	Al	mg/l	5,0
Arsénico total	As	mg/l	0,1
Cadmio	Cd	mg/l	0,02
Cianuro total	CN ⁻	mg/l	1,0
Cinc	Zn	mg/l	10,0
Cloro Activo	Cl	mg/l	0,5
Cloroformo	Extracto carbón cloroformo	mg/l	0,1
Cobalto total	Co	mg/l	0,5
Cobre	Cu	mg/l	1,0
Compuestos fenólicos	Expresado como fenol	mg/l	0,2
Compuestos organoclorados	Organoclorados totales	mg/l	0,05
Cromo Hexavalente	Cr ⁶⁺	mg/l	0,5
Demanda Bioquímica de Oxígeno (5 días)	DBO ₅	mg/l	250,0
Demanda Química de Oxígeno	DQO	mg/l	500,0
Dicloroetileno	Dicloroetileno	mg/l	1,0
Fósforo Total	P	mg/l	15,0
Hidrocarburos Totales de Petróleo	TPH	mg/l	20,0
Hierro total	Fe	mg/l	25,0
Manganeso total	Mn	mg/l	10,0
Mercurio (total)	Hg	mg/l	0,01
Níquel	Ni	mg/l	2,0
Nitrógeno Total Kjeldahl	N	mg/l	60,0
Organofosforados	Especies Totales	mg/l	0,1
Plata	Ag	mg/l	0,5
Plomo	Pb	mg/l	0,5
Potencial de hidrógeno	pH		6-9
Selenio	Se	mg/l	0,5
Sólidos Sedimentables		ml/l	20,0
Sólidos Suspendedos Totales		mg/l	220,0
Sólidos totales		mg/l	1 600,0
Sulfatos	SO ₄ ⁻²	mg/l	400,0
Sulfuros	S	mg/l	1,0
Temperatura	°C		< 40,0

Fuente: (Texto Unificado de Legislación Secundario, 2015)

CAPÍTULO III

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1 Metodología de la Investigación

3.1.1 *Tipo de la Investigación*

La presente investigación es de tipo Exploratoria – Descriptiva por la razón de que se trabaja con una serie de datos obtenidos de la investigación con el fin de especificar las características principales de comunidades bacterianas bajo análisis y se realiza un estudio independiente de cada característica, para describir cómo es o cómo se manifiesta el fenómeno. Pese a que existen estudios similares dentro del campo de ambientes contaminados con cromo, las características y factores a analizar en esta investigación se enfocan en un ambiente diferente dentro del Ecuador.

3.1.2 *Enfoque de la Investigación*

La presente investigación se desarrolló conforme a un enfoque mixto (Hernández – Sampieri, Fernández & Baptista, 2003, pp. 237), es decir que unifica las características de los modelos cuantitativo y cualitativo; debido a que al utilizar diferentes concentraciones del metal pesado se determinará mediante observación, la concentración hasta la que la bacteria es capaz de crecer; pero también será posible conocer el número de colonias resultantes de cada ensayo.

3.1.3 *Diseño de la investigación*

El diseño que caracteriza a la investigación en cuestión, es el diseño Experimental debido a que no solo se identifican las características que se estudian, sino que se manipula la variable independiente con el objetivo de observar los resultados de la variación de las concentraciones de metales pesados.

3.2 Unidad de Análisis

Agua residual generada en la empresa "CURTIEMBRE QUISAPINCHA", ubicada en la parroquia San Antonio de Quisapincha del cantón Ambato, provincia de Tungurahua, Ecuador.

3.3 Etapas de la investigación

La presente investigación se desarrolló en cinco etapas que se detallan a continuación.

3.3.1 *Recolección de muestras*

3.3.1.1 *Área de procedencia de las muestras*

La Parroquia San Antonio de Quisapincha se encuentra ubicada al suroccidente de la provincia de Tungurahua, entre las coordenadas 1° 05' a 1° 20' de latitud Sur y 78° 37' y 78° 55' de longitud Oeste, a 12 kilómetros de Ambato y a tres mil metros sobre el nivel del mar con una superficie de 119.9 Km² y una temperatura promedio de 12°C. Cuenta con 12 comunidades y una población total de 13.001 habitantes, su principal actividad económica es la agricultura y actividades pecuarias, por otro lado, es considerada como un sector altamente productivo y dedicado a la confección de todo tipo de productos de cuero (Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial, Quisapincha, 2011).

3.3.1.2 *Muestreo*

- Se realizó un reconocimiento de la Curtiembre Quisapincha con sus respectivos procesos, para seleccionar los puntos de muestreo.
- Se recolectaron tres muestras de agua residual, numeradas y etiquetadas como se muestra en la Tabla 3-1:

Tabla 3-1. Numeración e identificación de los puntos de muestreo.

Número de muestra	Fuente
M1	Agua residual estancada del canal de salida a la planta de tratamiento desde los procesos de pelambre y curtido.

M2	Agua residual estancada del canal de salida a la planta de tratamiento desde el proceso de curtido.
M3	Agua residual estancada del lavado de los equipos de cada proceso.

Realizado por: NAVARRETE, Vanessa. 2017

Las muestras para la caracterización físico-química y biológica, fueron recolectadas de los puntos seleccionados (Tabla 3-1), haciendo uso de envases de plástico estériles de 100 ml; cada muestra fue recolectada en los recipientes previamente enjuagados 3 veces con el agua de las respectivas muestras, luego colocados y transportados en un cooler.

3.3.2 Aislamiento

Para la selección y aislamiento de las colonias de bacterias a partir de las muestras del agua residual de la curtiembre se utilizaron tres medios de cultivo distintos con un mismo tipo de agar como base.

3.3.2.1 Medios de cultivo

El medio que se seleccionó como agar base fue Plate Count Agar (PCA), el cual presenta una composición rica en nutrientes (ver Tabla 3-2), lo que hace posible un crecimiento sin restricciones.

Tabla 3-2. Composición de Plate Count Agar (PCA)

Componente	Cantidad (g/l)
Tryptona	5,00
Extracto de levadura	2,50
Glucosa	1,00
Agar-agar	15,00
pH final:	7.0 ± 0,2

Fuente: Allaert y Escolà, 2002. pp. 156.

Realizado por: NAVARRETE, Vanessa. 2017

Con este medio base se prepararon tres medios diferentes:

✓ **Medio PCA sin presión selectiva.** El medio inicial se preparó según las indicaciones del envase: 23,5 gramos de medio en 1 litro de agua destilada, estableciendo una relación para la preparación del volumen total del medio; se llevó a ebullición y se esterilizó durante 15 min a 121°C, para posteriormente ser distribuido en placas Petri.

✓ **Medio PCA + presión selectiva. (medio A):** Éste medio fue suplementado con una solución de dicromato de potasio (25 µg/ml) como agente de presión selectiva. Antes de adicionar la solución del metal, el medio fue esterilizado.

✓ **Medio PCA + presión selectiva (medio B):** Para la preparación de este medio se utilizó como disolvente al efluente del proceso, esterilizado, filtrado y diluido en agua destilada (1:10). Con el disolvente descrito se procedió a preparar el medio siguiendo las indicaciones del envase.

3.3.2.2 *Siembra*

Previamente a la siembra de las muestras, se realizó un ensayo de siembra en placas de PCA y placas con presión selectiva, con el fin de tener una estimación de la tasa poblacional microbiana presente en cada muestra.

Con los resultados del ensayo previo, se procedió a realizar la siembra, siguiendo el protocolo que se describe a continuación:

- Se inocularon 10 µL de cada muestra sin dilución y 25 µL de las muestras en diluciones de 10^{-1} y 10^{-2} , en los medios establecidos, mediante extensión en placa con la ayuda de una espátula de Drigalski.
- Las siembras se realizaron por triplicado y, posteriormente se dejaron incubar a 20 °C hasta observar crecimiento.
- Al terminar el periodo de incubación se realizó un conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en cada caja.

3.3.2.3 *Selección y aislamiento de las colonias*

- Se procedió a la selección de al menos un representante de las colonias obtenidas en las placas.
- Se seleccionaron clones que procedían de los medios A, B y PCA sin presión selectiva; se repicaron en placas con medio A y medio B, previamente divididas en cuadrantes, y fueron incubados a una temperatura de 20°C

- Se realizaron alrededor de cuatro repiques hasta lograr la estabilización del crecimiento de los clones.
- Una vez obtenidos los clones aislados, se realizó un reaislamiento de los mismos por la técnica de agotamiento en superficie (Alarcón & Olivas, 2001, pp. 17, 18), utilizando placas de medio PCA suplementado con Cr^{+6} a una concentración igual a la inicial (25 ppm), para asegurar la adaptación de los clones al medio de cultivo con presión selectiva.

Procedimiento:

- ✓ Se prepararon cajas Petri con medio PCA suplementado con 25 ppm de Cr^{+6} .
- ✓ Se etiquetó cada placa con el número del clon y el medio del que provenían.
- ✓ Dentro de la cámara de bioseguridad, se tomó un inóculo de cada clon con un asa estéril y se procedió a sembrarlo mediante agotamiento en superficie.
- ✓ Se incubó por 24 horas a una temperatura de 20°C.
- ✓ Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a tomar una colonia aislada de la siembra de cada clon, con un palillo estéril y se sembró en los medios correspondientes para su posterior caracterización.

3.3.3 *Caracterización*

- Previo a la caracterización macroscópica, se aplicó la técnica de Tinción diferencial de Gram, la cual permite identificar grupos de bacterias según su coloración en gramnegativas o grampositivas, y según su morfología microscópica en bacilos o cocos (Alarcón & Olivas, 2001, pp. 14, 15).
- Sobre los clones aislados por agotamiento, se realizó una descripción macroscópica de los clones estabilizados en los medios A y B, mediante observación de las siguientes características: forma, margen, elevación y coloración que exhiben en el medio que se han desarrollado.

3.3.4 *Evaluación de la tolerancia a metales pesados (Cr, Pb y Hg).*

En esta etapa, los clones seleccionados y estabilizados, fueron sembrados en el medio PCA suplementado con soluciones de metales pesados (Cr, Pb y Hg) a concentraciones crecientes (ver Tabla 3-3).

Las sales de metales utilizadas fueron: Dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) para Cr^{+6} , Sulfato de plomo ($PbSO_4$) para Pb^{+2} y Sulfato de mercurio ($HgSO_4$) para Hg^{+2} . Posterior a cada siembra, los cultivos fueron incubados a una temperatura de $20^\circ C$ hasta obtener crecimiento.

- Los clones se repicaron del medio en el que se los aisló a los medios con metales, usando palillos de madera esterilizados, sin regresar el palillo a la colonia original con el siguiente orden: Hg, Cr y Pb de acuerdo al ensayo indicado; añadiendo al final un control de PCA + Cr^{+6} a 25 ppm para comprobar que efectivamente se realizó la siembra de los clones en todos los medios.
- Aquellos clones que lograron crecer en cada uno de los ensayos, fueron repicados nuevamente a otro medio de mayor concentración. El proceso se aplicó sucesivamente hasta obtener aquellos clones que presentaran mayor nivel de tolerancia a las diferentes concentraciones de cada metal.
- El crecimiento de cada cultivo bacteriano se determinó visualmente como positivo (crecimiento) o negativo (sin crecimiento).
- Se utilizaron dos controles bacterianos no ambientales, con cepas ATCC aisladas de muestras clínicas: *Pseudomona aureginosa* ATCC9027 y *Klebsiella neumoniae* ATCC13883.

Tabla 3-3. Concentraciones evaluadas en cada ensayo de tolerancia a metales pesados.

Metal	Concentración ($\mu g/ml$)									
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
Hg	50	100	400	500	600	700	800			
Cr	50	100	400	500	600	700	800	900	1000	
Pb	50	100	400	500	800	1200	1500	1800	2000	2100

E: ensayo.

Realizado por: NAVARRETE Vanessa, 2017.

- Una vez culminada la evaluación de tolerancia, se procedió a evaluar la tolerancia cruzada en los metales evaluados. Para ello se tomaron los clones que crecieron hasta la concentración máxima de cada metal y se repicaron en medios suplementados con los otros metales, para comprobar la tolerancia final. Aquellos clones evaluados por su tolerancia a Hg, pasarían nuevamente a ser evaluados en Cr y Pb, y de la misma manera para aquellos clones de Pb y Cr en los medios respectivos (Tabla 3-4).

Tabla 3-4. Concentraciones de Pb, Cr y Hg aplicadas.

Clones	Metales		
	Hg (µg/ml)	Cr (µg/ml)	Pb (µg/ml)
<i>Clones-Pb</i>	[500]	[500]	
	[600]	[600]	
	[700]	[800]	
<i>Clones-Cr</i>	[500]		[1500]
	[600]		
	[700]		[1800]
<i>Clones-Hg</i>		[400]	[1500]
		[500]	[1800]

Realizado por: NAVARRETE Vanessa, 2017.

3.3.4.1 Evaluación de la capacidad de crecimiento a 10°C, 20°C y 35°C

La temperatura establecida para los ensayos realizados fue de 20°C en base a la temperatura tomada *in situ* en el área de muestreo y a previos ensayos de temperatura, en los que se definió la temperatura apropiada a la que las colonias presentaban un crecimiento adecuado.

La temperatura promedio del área de muestreo es de 12°C a lo largo del año, según el Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial de la parroquia Quisapincha (2015), alcanzando incluso temperaturas por debajo de los 12°C. Tomando en cuenta los datos expuestos, se realizaron pruebas de temperatura con los clones aislados, con el fin de valorar la capacidad de crecimiento frente a metales pesados (Pb, Hg, Cr) a temperaturas bajas, comparando su desarrollo con controles en PCA sin presión de metal, hasta observar crecimiento. Además se los evaluó en una temperatura de 35°C para conocer si existe la presencia de microorganismos, dentro de los clones aislados, con características de patógenos.

Los medios en los que se llevó a cabo estas evaluaciones fueron suplementados con concentraciones de 1500 ppm para Pb y de 500 ppm para Hg y Cr, seleccionando a los clones correspondientes a los medios con estas concentraciones; en las cuales se observó un decrecimiento mínimo de clones en los ensayos de tolerancia a metales pesados.

Las placas fueron incubadas a temperaturas de 35°C, 20°C y 10°C; realizando un análisis de crecimiento cada 24 horas durante un periodo total de 96 horas, el cual se determinó mediante la medición de los diámetros de cada clon.

3.3.5 Identificación bioquímica

La identificación de los clones aislados se realizó mediante una serie de pruebas bioquímicas (medios diferenciales) que permitieron evaluar la expresión metabólica de los grupos bacterianos (ver Tabla 3-5), consiguiendo diferenciarlos a nivel de género e incluso de especie (Bailón, Cervantes & Cruz, 2003. pp. 35).

Tabla 3-5. Pruebas bioquímicas de identificación

Pruebas Bioquímicas	Medio de cultivo o Reactivos	Fundamento	Consistencia del medio	Inoculación
<i>Prueba de oxidasa</i>	Tiras reactivas impregnadas con oxidasa y reactivo de Barry.	Presencia de citocromo oxidasa.	Tiras reactivas	Inoculo impregnado sobre una tira de oxidasa.
<i>Prueba de catalasa</i>	Peróxido de hidrogeno al 3%.	Presencia de la enzima <i>catalasa</i> .	Peróxido de hidrogeno.	Inoculo dispuesto sobre una gota de H ₂ O ₂ en portaobjetos.
<i>Prueba de Citrato</i>	Citrato de Simmons.	Capacidad de usar el citrato como fuente de carbono.	Sólido en pico de flauta	Estriado único en la superficie del pico de flauta.
<i>Prueba de movilidad, sulfuro, Indol</i>	Medio SIM	Producción de H ₂ S, Indol y detección de movilidad.	Semisólido vertical en tubos	Picadura en forma vertical.
<i>Reacción a la ureasa</i>	Agar Base para urea y Urea al 40%.	Capacidad de hidrolizar la urea por acción de la <i>ureasa</i> .	Sólido en pico de flauta	Estriado sobre la superficie del pico de flauta.
<i>Prueba de fermentación de carbohidratos</i>	Agar Hierro Triple Azúcar (TSI).	Fermentación de glucosa, lactosa con producción de gas y H ₂ S	Sólido en pico de flauta	Picadura y estría en la superficie del pico de flauta.
<i>Prueba de fermentación de Manitol</i>	Agar Manitol Salado.	Fermentación de manitol y crecimiento en un medio de alta concentración salina.	Sólido dispensado en cajas Petri	Estriado sobre la superficie del agar.
<i>Prueba de la Coagulasa</i>	Plasma humano, estéril fresco.	Coagulación de plasma por acción de la <i>coagulasa</i> .	Líquido vertical en tubos	Inocular el plasma con la muestra.

<i>Identificación de hemolisis</i>	Agar Sangre (BA) enriquecido con sangre humana.	Detectar el tipo de reacción hemolítica del microorganismo.	Sólido dispensado en cajas Petri	Estriado sobre la superficie del agar.
------------------------------------	---	---	----------------------------------	--

Realizado por: NAVARRETE Vanessa, 2017.

Fuente: MacFaddin, 2003.

Antibiograma

Como procedimiento adicional se realizaron pruebas de sensibilidad o resistencia a antibióticos de los clones identificados mediante el método descrito por Sacsquispe, R. & Velásquez, J. (2002. pp.13-19):

- Se dispuso una suspensión directa en caldo soya tripticasa (TSB), a partir del inóculo de los microorganismos (9 clones identificados) reaislados en agar Tripticasa de Soya (TSA); fue necesario ajustar la concentración celular a una densidad equivalente a 0,5 en la escala de Mc. Farland, comparando los tubos de caldo inoculados con una suspensión de sulfato de bario que presenta esta densidad.
- Se procedió a la siembra de la suspensión bacteriana en placas con Agar Mueller Hinton con la ayuda de un hisopo estéril, se inoculó en la superficie de las placas formando estrías en tres direcciones para garantizar su distribución uniforme y se dejó reposar de 3 a 5 minutos.
- Finalmente, se colocaron los discos de antibióticos individuales sobre la superficie del agar utilizando una pinza estéril y presionando con su punta suavemente sobre cada disco para fijar el contacto completo con la superficie del agar.
- Las cajas fueron selladas con cinta petrifilm e incubadas en posición invertida a 20 °C, después de un periodo de 24 horas se realizó la lectura de las placas y medición del diámetro de los halos de inhibición.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Recolección de las muestras

Las muestras seleccionadas para la investigación fueron obtenidas de los efluentes de la empresa Curtiembre Quisapincha, a partir del sistema de canales de la planta de tratamiento, provenientes de los procesos de pelambre y curtido (Muestra 1), solo del proceso de curtido (Muestra 2) y agua residual estancada del lavado de los equipos de cada proceso (Muestra 3), como se observa en la Figura 4-1.

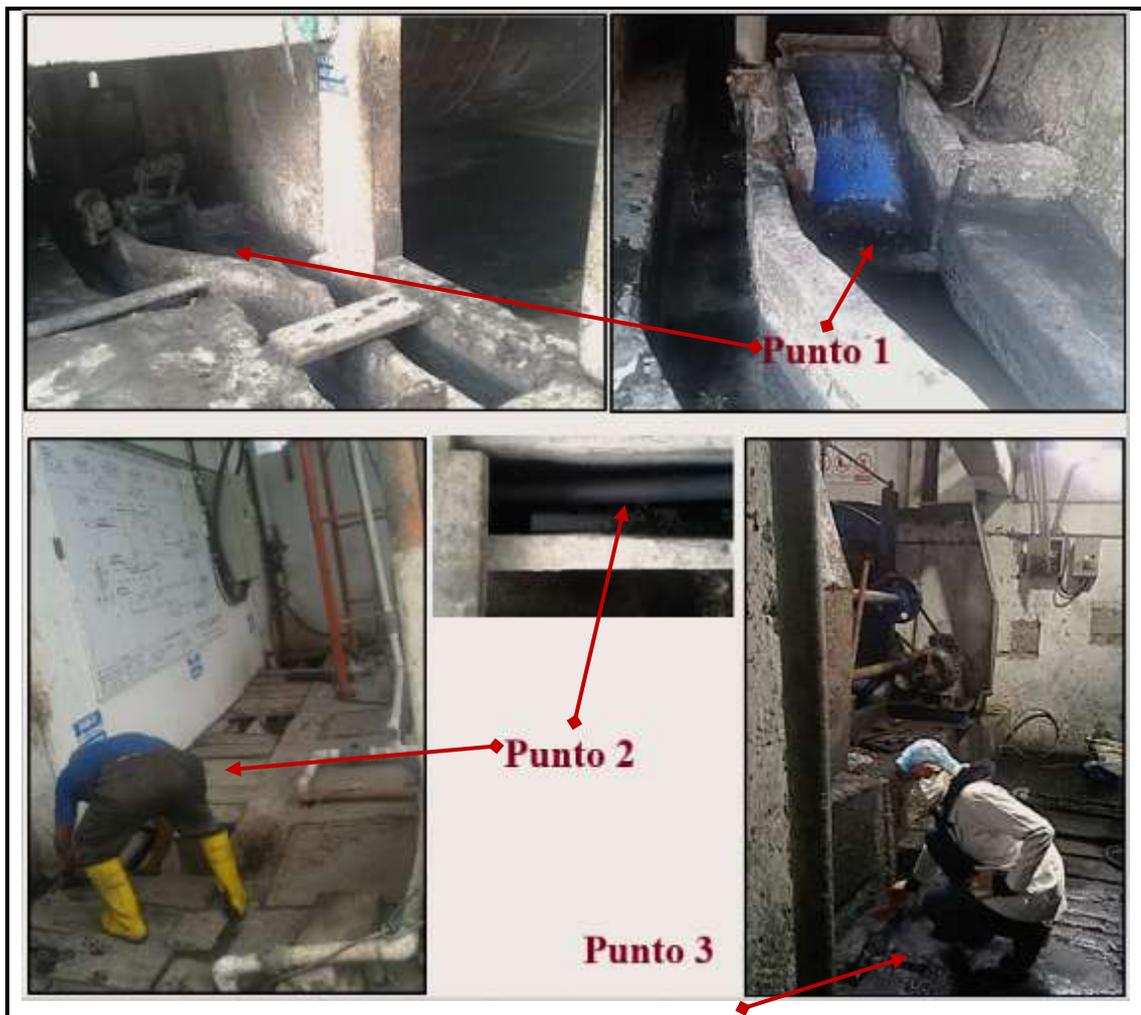


Figura 4-1 Identificación de puntos de muestreo

Fuente: Navarrete Vanessa, 2017

También se obtuvo una muestra del agua del bombo de madera o 'fulón' utilizado en el proceso de curtido, en donde se colocan las sales de cromo para transformar las pieles en cuero asegurando su estabilidad química y biológica.



Figura 4-2 Bombo o 'fulón' para curtido de pieles

Fuente: Navarrete Vanessa, 2017

4.1.1 Caracterización físico-química y biológica de los efluentes

En la Tabla 4.1 se describen los resultados de los principales parámetros analizados de los efluentes de la empresa Curtiembre Quisapincha. Estos parámetros pueden ser comparados con los límites establecidos en el apartado *Normas generales para descarga de efluentes al sistema de alcantarillado* de la Norma de Calidad Ambiental y de descarga de efluentes al recurso agua, Anexo 1, Libro VI (Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente, 2015).

Tabla 4-1. Análisis físico-químicos y biológicos de las muestras de los efluentes de Curtiembre Quisapincha.

Parámetro	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Límite máximo permisible Tabla 9 (TULSMA)
Potencial hidrógeno (pH)	10.68	2.95	6.55	6-9
Demanda Bioquímica de Oxígeno (5 días)	680 mg/l	2160 mg/l	1080 mg/l	250 mg/l
Demanda Química de Oxígeno	4760 mg/l	1490 mg/l	1950 mg/l	500 mg/l
Cromo hexavalente	1,34 mg/l	9,1 mg/l	3,5 mg/l	0,5 mg/l

Plomo	Ausencia	Ausencia	Ausencia	0,5 mg/l
Mercurio	4,3 mg/l	7,1 mg/l	2,8 mg/l	0,01 mg/l
Conductividad	17.6 mS/cm	19.1 mS/cm	14.8 mS/cm	---
Sales	10	4.7	8.6	---
Sólidos disueltos totales (TDS)	9.8 g/l	5 g/l	8 g/l	---

Realizado por: NAVARRETE, Vanessa. 2017

Los resultados del análisis físico-químico y biológico del agua residual de la curtiembre (Tabla 4-1) muestran valores por encima de los límites establecidos para descargas al sistema de alcantarillado público y a cuerpos de agua dulce representado una potencial fuente de contaminación (Texto Unificado de Legislación Secundario, 2015), sin embargo, es importante tener presente que los efluentes analizados correspondían a agua residual sin un previo tratamiento; la cual fue seleccionada dado que los altos niveles de contaminación favorecen la presencia de microorganismos resistentes a metales pesados.

Con relación a los valores obtenidos de los análisis de metales plomo, cromo y mercurio (Tabla 4-1), se encontraron niveles elevados de cromo hexavalente y mercurio, lo que permite afirmar que en las muestras de agua existe una presión selectiva que puede favorecer la selección de bacterias resistentes a metales pesados, Cr y Hg en particular, como se ha reportado en estudios de microorganismos aislados de efluentes de la industria curtidora, los cuales presentaron resistencia a metales como Zn, Cu, Cr, Hg y Pb (Tamil *et al.*, 2012).

4.2 Aislamiento de colonias

4.2.1. Siembra y estimación del número de UFC de las muestras

El ensayo para obtener un estimado inicial del número de colonias mostró un número incontable de colonias en cada placa, con lo que se evidenció la presencia de un alto número de microorganismos capaces de crecer en las condiciones seleccionadas, por lo que para los ensayos de aislamiento se decidió realizar diluciones (10^{-1} y 10^{-2}) en cada muestra; de las cuales se inocularon 25 μ L en los tres medios e igualmente, 10 μ L de cada muestra sin dilución. Los resultados se detallan en las Tablas 4-2, 4-3 y 4-4.

Tabla 4-2. Estimación del número de UFC de la muestra M1.

Muestra M1			
Dilución	<i>Medios de cultivo</i>		
	PCA (UFC/ml)	PCA + Cr⁺⁶ 25 ppm (medio A) - UFC/ml	PCA + efluente líquido (medio B) - UFC/ml
10⁻¹	3,60x10 ³	1,6 x10 ²	3,2x10 ³
10⁻²	1,20x10 ³	4,0 x10 ²	4,0x10 ²
SD	1,10x10 ³	2,0 x10 ²	7,0x10 ²
Promedio	1,97x10 ³	7,33x10 ²	1,43x10 ³

“SD”: Sin dilución.

Realizado por: NAVARRETE, Vanessa. 2017.

En la Tabla 4-2 se observa una mayor cantidad de microorganismos en el medio PCA seguido por el medio B, con lo que se presume que existe cierta preferencia de los microorganismos por los componentes presentes en el medio B a diferencia del medio A, lo cual puede deberse a que en el agua de la muestra M1 se encontró una baja concentración de cromo (1,34 mg/l) con respecto a las otras muestras.

Tabla 4-3. Estimación del número de UFC de la muestra M2.

Muestra M2			
Dilución	<i>Medios de cultivo</i>		
	PCA (UFC/ml)	PCA + Cr⁺⁶ 25 ppm (medio A) - UFC/ml	PCA + efluente líquido (medio B) - UFC/ml
10⁻¹	1,6x10 ³	4,4x10 ³	0
10⁻²	1,2x10 ³	4,0x10 ³	0
SD	1,0x10 ³	1,2x10 ³	2,0x10 ²
Promedio	1,27x10 ³	3,2x10 ³	6,67x10 ¹

“SD”: sin dilución

Realizado por: NAVARRETE, Vanessa. 2017.

Los resultados expuestos en la Tabla 4-3 nos permiten apreciar un mayor número de UFC de la muestra M2 en el medio A. Esta particularidad puede deberse a que la muestra corresponde al efluente del curtido, proceso en donde se utilizan sales de cromo; y a la composición físico-química del agua de la muestra (Tabla 4-1), que denota la presencia de una concentración de 9,1 mg/l de Cr⁺⁶.

Los resultados obtenidos del conteo de UFC de la muestra M3 presentó una mayor cantidad de UFC en el medio A (Tabla 4-4) al igual que se muestra en los resultados del conteo microbiológico de la muestra M2, lo cual permite asegurar una población bacteriana resistente a cromo en el agua analizada, principalmente en las muestras M2 y M3.

Tabla 4-4. Estimación del número de UFC de la muestra M3.

Muestra M3			
Dilución	Medios de cultivo		
	PCA (UFC/ml)	PCA + Cr ⁺⁶ 25 ppm (medio A) - UFC/ml	PCA + efluente líquido (medio B) - UFC/ml
10 ⁻¹	5,23x10 ⁵	6,72x10 ⁵	3,12x10 ⁵
10 ⁻²	4,04x10 ⁴	9,04x10 ⁴	3,56x10 ⁴
SD	2,24x10 ⁵	2,15x10 ⁵	9,64 x10 ⁴
Promedio	2,63x10 ⁵	3,26x10 ⁵	1,48x10 ⁵

“SD”: Sin dilución.

Realizado por: NAVARRETE, Vanessa. 2017.

Los recuentos bacterianos obtenidos presentaron diferentes tasas de crecimiento en función del medio utilizado como se muestra en la Figura 4-3, atribuyendo dicha particularidad a la procedencia del agua de cada muestra y entre otros factores a su respectiva composición físico-química, en la que se observó niveles elevados de cromo y mercurio.

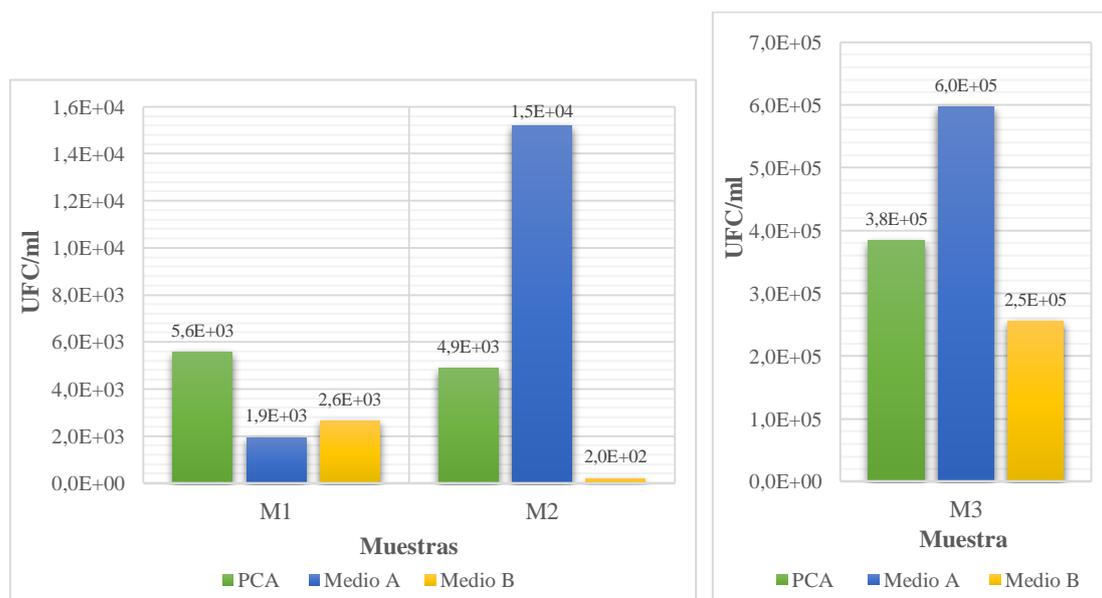


Figura 4-3 Promedio del número de UFC de cada muestra en los 3 medios.

Realizado por: NAVARRETE, Vanessa. 2017.

El mayor crecimiento en los tres medios, se obtuvo en la muestra M3 como se observa en la Figura 4-3, lo cual puede deberse a que dicha muestra posee un pH cercano a neutro (6,33), condición que posiblemente favorecería a una mayor presencia de microorganismos en esta muestra; mientras que las muestras M1 y M2 presentaron un pH alcalino (10,68) y ácido (2,95) respectivamente, con lo que se presume que esta condición pudo haber restringido el número de microorganismos en estas muestras. Es importante hacer notar que en el caso de las muestras M2 y M3 el mayor

nivel de crecimiento fue observado para el medio suplementado con cromo (medio A), lo que demuestra la presencia de bacterias en dichas muestras, dependientes de cromo.

A pesar de las diferencias de crecimiento descritas en cada caso, es posible afirmar la presencia de bacterias que han desarrollado mecanismos de resistencia a metales pesados, en aguas residuales de origen industrial contaminadas con metales, en este caso de una curtiembre. Diversos autores reportan microorganismos aislados de este tipo de aguas, con los cuales se evaluó la capacidad de tolerancia a metales pesados (Tamil, *et al.*, 2012), (Alam, *et al.*, 2010), con lo que fue posible asegurar las posteriores pruebas de tolerancia a metales pesados establecidas en el presente estudio.

4.2.2. Selección y aislamiento de las colonias

De cada placa sembrada se procedió a la selección de al menos un representante de cada uno de los tipos de colonias obtenidos, los cuales fueron repicados en placas de medio A y B. De acuerdo a esto se seleccionaron 96 colonias de las cuales, las 16 primeras corresponden a la muestra M1, 16 de la muestra M2 y 64 a la muestra M3 (Tabla 4-5) ya que de ésta última se obtuvo un mayor número de UFC en los tres medios.

Tabla 4-5. Identificación de las colonias seleccionadas para la caracterización.

Identificación de las colonias seleccionadas									
Muestra	Medio B			Medio A			PCA		Total
	SD	10 ⁻²	10 ⁻¹	SD	10 ⁻²	10 ⁻¹	SD	10 ⁻²	
M1	1-6	7-8	---	9-12	---	---	13-16	---	16
M2	---	---	---	17-18	19-26	27-32	---	---	16
M3	---	33-46	47-56	---	57-70	71-86	---	87-96	64

"SD": Sin dilución.

Realizado por: NAVARRETE, Vanessa. 2017.

- Se realizaron al menos 4 repiques consecutivos para lograr la adaptación y estabilización del crecimiento de los clones seleccionados.
- Posteriormente, se realizó un reaislamiento de los clones estabilizados utilizando placas de medio PCA suplementado con Cr⁺⁶ a una concentración igual a la inicial (25 ppm).

4.3 Caracterización macroscópica y microscópica

4.3.1 Tinción Gram

Mediante la técnica de Tinción de Gram fue posible identificar la morfología microscópica de los clones aislados y su comportamiento ante esta tinción diferencial. Los resultados representados en la Figura 4-4 revelan que el 62% de clones aislados corresponden al grupo de bacterias grampositivas, mientras que el 38% al grupo de bacterias gramnegativas.

Diversos autores han reportado bacterias aisladas de efluentes de curtiembres pertenecientes tanto al grupo de Gram positivos como de Gram negativos, con las cuales se han trabajado en una serie de investigaciones relacionadas con resistencia a metales pesados y reducción de cromo hexavalente (Mullick, Urmi, 2012, pp. 30-40) (Alexander, M. 1999, pp. 378); otorgando coherencia a los resultados obtenidos.

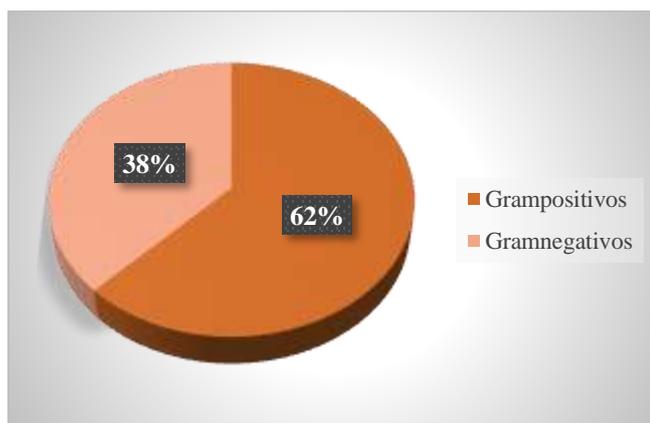


Figura 4-4 Porcentaje de clones bacterianos Grampositivos y Gramnegativos.
Realizado por: NAVARRETE, Vanessa. 2017.

Una vez analizadas las características microscópicas, fue necesario la selección de clones que en base a los resultados de la tinción de Gram presentaran un solo grupo de bacterias en la misma colonia; de los cuales resultaron 66 clones procedentes de los medios A y B, mismos que fueron sometidos a posteriores caracterizaciones macroscópicas y pruebas de tolerancia a metales pesados.

4.3.2 Caracterización de la morfología macroscópica de los clones aislados.

La evaluación de la caracterización macroscópica se la realizó a los clones aislados y estabilizados, en base a las características morfológicas que presentaron en los medios que fueron

aislados, de modo que se observaron mínimas variaciones para cada una de las morfologías analizadas.

4.3.3.1 Forma

Las formas características de los clones aislados se detallan en la Figura 4-5. Se encontró un mayor porcentaje de clones con morfología circular tanto en el medio A (45,5%) como el medio B (36,4%). Los clones con formas irregular y filamentosa se presentan en igual cantidad en el medio A, con un 20,5% para ambas; mientras que en el medio B los clones con apariencia filamentosa representan un 11,3% más que aquellos de forma irregular. Los resultados correspondientes a esta característica denotan una relación entre la forma de los clones y el tipo de medio.

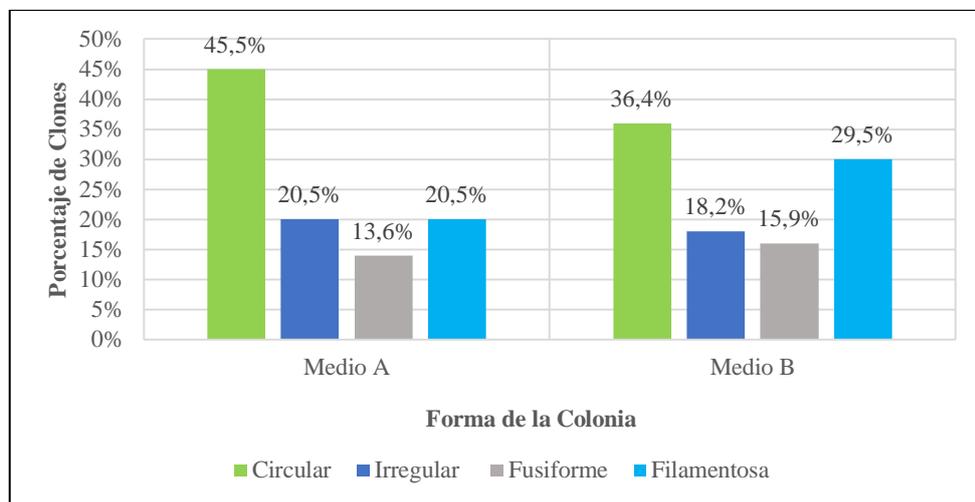


Figura 4-5 Porcentaje de clones bacterianos que presentan un tipo de forma.
Realizado por: NAVARRETE, Vanessa. 2017

4.3.3.2 Borde

El borde de los clones analizados mostraron 4 tipos (Figura 4-6), con una predominancia del 43,2% de borde entero para los clones en el medio A; en tanto que en el medio B predomina el borde rizado con un 47,7% y solo un 11,4% para clones de borde entero, lo que podría interpretarse como un rasgo de adaptación de los clones a dicho medio debido posiblemente a cierta particularidad en sus componentes que permite un desarrollo invasivo de los clones.

También se observaron bordes de tipo ondulado y lobulado en el medio A, con un 20,5% y 9,1% respectivamente, mientras que para clones del medio B se obtuvo un 25% de clones con borde

ondulado y un 15,9% con borde lobulado, presentándose aún un mayor porcentaje de clones con bordes diferentes al entero en este medio.

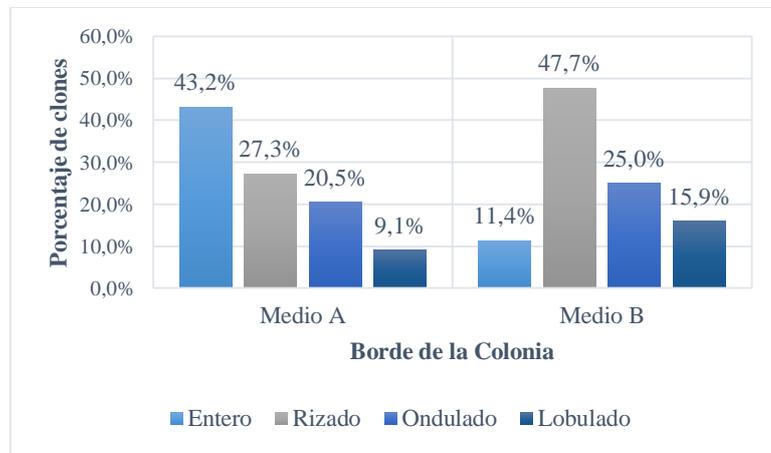


Figura 4-6. Porcentaje de clones bacterianos que presentan un tipo de borde.

Realizado por: NAVARRETE, Vanessa. 2017

4.3.3.3 Elevación

Los resultados del análisis de la elevación de los clones bacterianos presentaron variados tipos de elevación en ambos medios, siendo las más expresadas para ambos casos la elevación convexa y la elevación plana, sin embargo, es posible notar cierta similitud entre los clones de los dos medios como se representa en la Figura 4-7, por lo que es posible que en este caso la composición de los medios no interfiriera en el desarrollo del tipo de elevación de los clones como en los anteriores casos con respecto a forma y borde.

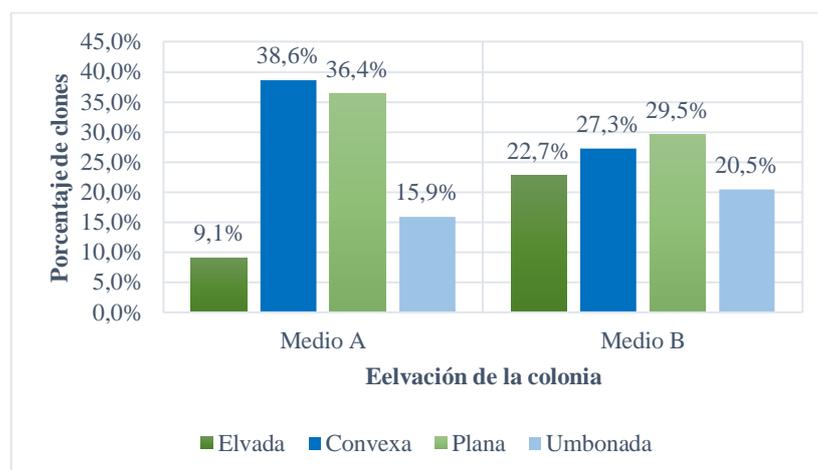


Figura 4-7 Porcentaje de clones bacterianos que presentan un tipo de elevación.

Realizado por: NAVARRETE, Vanessa. 2017

4.3.3.4 Color

El análisis de la coloración que expresaron los clones en los medios utilizados reveló variaciones en cada caso como se representa en la Figura 4-8. Se observó un color blanco predominante en los clones repicados en el medio A con un 61,4% en relación a la predominancia del color crema/beige expresada en los clones del medio B, con un 52,3%.

Tanto en el medio A como en el medio B se obtuvieron 3 tipos de coloraciones: blanco, crema y marfil; sin embargo, se encontró una variación de color expresada en un pequeño porcentaje de clones del medio B correspondiente a un rosa pálido, lo cual puede deberse a la influencia de la composición del medio en el que se desarrollaron.

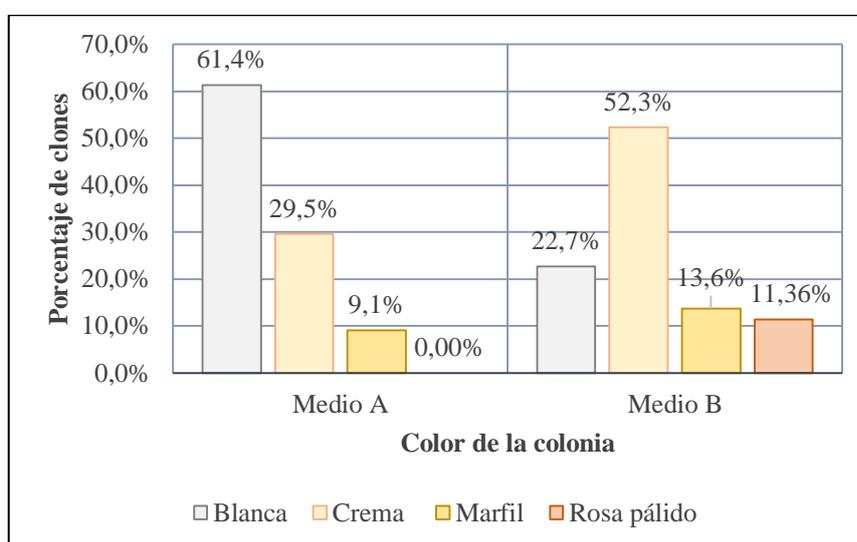


Figura 4-8 Porcentaje de clones bacterianos que presentan diferentes colores.
Realizado por: NAVARRETE, Vanessa. 2017

4.4 Pruebas de tolerancia a metales pesados.

La evaluación de tolerancia a cromo ($K_2Cr_2O_7$), mercurio ($HgSO_4$) y plomo ($PbSO_4$) permitió observar niveles de tolerancia diferentes para cada metal, dependiendo de las concentraciones de cada metal a las que fueron sometidos los clones aislados, los cuales fueron incubados a $20^\circ C$ en un rango de tiempo entre 1 y 5 días. El crecimiento relativo de los clones se expresó como porcentaje de los obtenidos en el control inicial de PCA+Cr⁺⁶ a 25 ppm el cual se tomó como 100%.

4.4.3 Tolerancia a cromo

Los ensayos para determinar la tolerancia a cromo hexavalente de los clones aislados se realizaron en medios con concentraciones crecientes del metal. Los resultados detallados del progreso que presentaron los clones aislados se muestran en la Tabla 4-6.

La mayoría de los clones mostraron un buen desarrollo entre 24 y 48 horas hasta el ensayo E3; sin embargo, al incrementar las concentraciones del metal en el medio se incrementó también el tiempo necesario para que los clones sobrevivientes presentaran crecimiento, es decir a partir del ensayo E4 fue necesario un intervalo de hasta 120 horas para observar crecimiento, haciéndose notar que a partir de este ensayo la capacidad de crecimiento disminuyó significativamente; como se observa en la Figura 4-9.

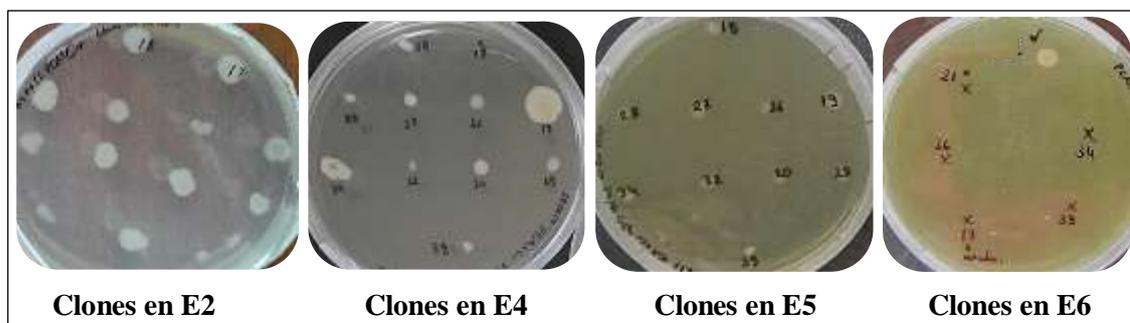


Figura 4-9 Desarrollo de los clones bacterianos en los ensayos de tolerancia a cromo.
Realizado por: NAVARRETE, Vanessa. 2017

Tabla 4-6. Ensayos de tolerancia a cromo.

Clon	Concentración de Cromo de cada ensayo ($\mu\text{g/mL}$)								
	<i>E1</i>	<i>E2</i>	<i>E3</i>	<i>E4</i>	<i>E5</i>	<i>E6</i>	<i>E7</i>	<i>E8</i>	<i>E9</i>
	50	100	400	500	600	700	800	900	1000
1	++	++	+	+	-				
2	++	++	++	+	+	-			
3	++	++	+	+	-				
4	++	++	++	+	-				
5	++	+	-						
6	++	++	+	+	-				
7	+	-							
8	++	+	-						
9	+	-							
10	++	+	-						
11	++	++	++	+	+	-			
12	++	++	++	+	+	-			
13	+	+	-						

14	++	++	++	++	+	-			
15	++	++	+	+	-				
16	+	-							
17	++	++	+	+	-				
18	++	++	++	+	+	-			
19	++	+	+	-					
20	++	+	-						
21	++	++	++	+	+	-			
22	++	+	+	-					
23	++	+	+	-					
24	++	+	+	-					
25	++	+	-						
26	++	++	++	+	+	-			
27	++	++	++	++	+	-			
28	++	++	++	++	++	++	+	+	-
29	++	++	++	+	-				
30	++	++	++	+	-				
31	++	++	+	+	-				
32	++	+	-						
33	++	++	++	+	+	-			
35	++	+	+	-					
36	++	+	+	-					
37	++	++	+	+	-				
38	++	++	+	-					
39	++	++	+	+	-				
40	++	++	+	+	-				
41	++	+	+	-					
42	++	++	+	+	-				
43	++	++	++	-					
44	++	++	++	+	+	-			
45	++	++	++	+	+	-			
47	++	++	+	+	-				
48	+	-							
49	++	++	+	-					
50	++	++	++	++	+	-			
51	++	++	+	-					
52	++	++	+	-					
53	++	++	++	++	+	-			
54	++	++	++	++	+	+	-		
58	++	++	++	+	+	-			
59	++	++	+	-					
60	++	++	+	-					
62	++	+	+	-					
63	++	++	++	+	-				
64	+	+	+	+	+	-			
65	++	++	++	++	+	-			
66	++	+	-						
67	++	+	-						
68	++	++	+	-					
70	++	++	++	++	+	-			
71	++	++	++	+	+	-			

72	++	++	+	-					
73	++	++	++	++	+	-			
CONTROLES									
<i>*P. a</i>	++	++	+	-					
<i>*K. n</i>	++	+	-						

"E": ensayo. "++": buen crecimiento. "+": crecimiento. "-": sin crecimiento. **P. a*: *Pseudomona aureoginosa*. **K. n*: *Klebsiella neumoniae*. Celdas en blanco: ensayos en los que no se realizó repique de los clones.

Realizado por: NAVARRETE, Vanessa. 2017.

Los resultados obtenidos para los ensayos de tolerancia a cromo en los clones mostraron una ligera disminución del desarrollo de éstos, desde la concentración de 100 µg/ml de cromo, presentando un efecto inhibitorio significativo a partir de una concentración de 400 µg/ml del metal hasta llegar a la mortalidad del 97% en la concentración de 800 µg/ml. Sin embargo, el 1,5% que corresponde al clon 28 (Tabla 4-6), logró una tolerancia de hasta 900 µg/ml del metal, como se muestra en la Figura 4-10.

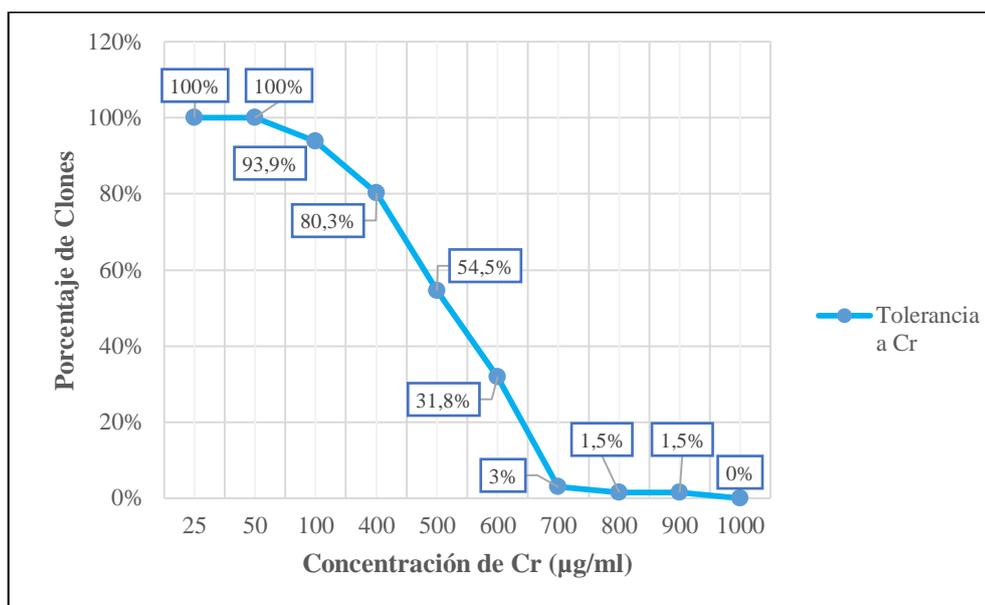


Figura 4-10 Perfil de tolerancia de los clones en presencia de cromo

Realizado por: NAVARRETE, Vanessa. 2017

Los resultados obtenidos de los ensayos de tolerancia a cromo, tienen concordancia con lo reportado por Sankar et, al. (2011) quienes aislaron bacterias de efluentes de curtiembres, las cuales presentaron tolerancia a altos niveles de cromato; específicamente a concentraciones de cromo hexavalente de más de 400 µg/ml.

La evaluación de los clones aislados en medios suplementados con diferentes concentraciones de Cr⁺⁶ mostró una aclimatación al entorno alterado; sin embargo, hay costos asociados con estas adaptaciones, observándose que el porcentaje de crecimiento de la población bacteriana

disminuye notablemente. El grado al cual un organismo es capaz de adaptarse es probablemente atribuible a su plasticidad fenotípica o la flexibilidad del organismo para alterar ciertos rasgos dentro de él. La tolerancia al Cr, según lo describen Gutiérrez & Cervantes (2008, pp.21-36), es principalmente un resultado secundario del metabolismo debido a la incorporación de cromatos por medio del transportador de sulfatos, mecanismo mediado por un sistema de transportadores como permeasas o incluso proteínas específicas como la ChrA; la asociación del metal con componentes de la superficie microbiana o la reducción enzimática de metales pesados dentro del citoplasma.

4.4.4 Tolerancia a mercurio

Los resultados de los ensayos para determinar la tolerancia a mercurio (Hg^{+2}) de los microorganismos aislados se detallan en Tabla 4-7.

La evaluación del crecimiento de los clones mostró un buen desarrollo entre 24 y 48 horas en los ensayos E1, E2 y E3; no obstante, al incrementar las concentraciones del metal en el medio, se incrementó a la vez el tiempo necesario para que los clones restantes lograsen crecer, es decir que a partir del ensayo E4 se necesitaron de hasta 120 horas para observar en su crecimiento.

Tabla 4-7. Ensayos de tolerancia a mercurio.

Clon	Concentración de Hg ($\mu\text{g/ml}$)						
	<i>E1</i>	<i>E2</i>	<i>E3</i>	<i>E4</i>	<i>E5</i>	<i>E6</i>	<i>E7</i>
	50	100	400	500	600	700	800
1	++	+	-				
2	+	+	-				
3	++	++	+	+	-		
4	++	+	++	++	+	-	
5	++	++	-				
6	++	++	++	+	+	-	
7	++	+	-				
8	+	-					
9	+	-					
10	++	++	-				
11	++	+	-				
12	++	+	-				
13	+	+	-				
14	++	+	-				
15	++	+	-				
16	++	++	++	++	+	-	
17	++	++	+	-			

18	+	-					
19	++	++	++	+	+	-	
20	++	++	++	++	+	-	
21	+	+	-				
22	++	++	++	++	+	+	-
23	++	++	++	++	+	-	
24	++	++	++	+	+	-	
25	+	-					
26	++	++	++	++	+	-	
27	++	++	++	+	+	-	
28	++	++	+	+	-		
29	++	++	++	++	+	-	
30	++	++	++	++	+		
31	++	++	++	+	+		
32	++	+	-				
33	++	++	++	+	+		
35	+	-					
36	+	+	-				
37	++	-					
38	+	+	-				
39	++	++	++	+	+	-	
40	++	++	++	+	-		
41	++	++	+	+	-		
42	++	++	++	++	+	-	
43	++	++	++	+	+	-	
44	++	++	++	++	+	-	
45	++	++	++	+	+	-	
47	++	++	+	+	-		
48	+	-					
49	+	-					
50	++	++	++	++	+	-	
51	++	++	++	++	+	-	
52	++	++	++	++	++	+	-
53	+	-					
54	++	++	++	+	+	-	
58	++	+	-				
59	++	++	++	++	+	-	
60	++	++	++	+	+	-	
62	+	-					
63	+	+	-				
64	+	+	-				
65	+	-					
66	+	-					
67	+	-					
68	+	+	-				
70	++	++	++	++	++	+	-
71	++	++	++	+	+	-	
72	++	++	++	+	+	-	
73	++	++	++	+	+	-	
CONTROLES							
<i>*P. a</i>	++	++	+	-			

*K. n	++	+	-				
-------	----	---	---	--	--	--	--

"E": ensayo. "++": buen crecimiento. "+": crecimiento. "-": sin crecimiento. *P. a: *Pseudomona aureoginosa*.

*K. n: *Klebsiella neumoniae*. Celdas en blanco: ensayos en los que no se realizó repique de los clones.

Realizado por: NAVARRETE, Vanessa. 2017.

En los ensayos de tolerancia realizados para mercurio se observó un declive en el desarrollo de los clones a partir de la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ (ensayo 2) con un 20% menos de los clones, hasta alcanzar su mortalidad absoluta en 800 $\mu\text{g/ml}$ del metal (Figura 4-12).

La concentración de mercurio a la que se observó una tolerancia bacteriana final fue la menor en comparación al límite de tolerancia en los demás metales analizados; sin embargo, del total de los clones analizados, la mitad de éstos (2%) expresaron una tolerancia hasta 500 $\mu\text{g/ml}$ de Hg y se obtuvo un 5%, que corresponde a los clones 22, 52 y 70 (Tabla 4-7), con capacidad de sobrevivir hasta los 700 $\mu\text{g/ml}$ de mercurio como se observa en la Figura 4-11.

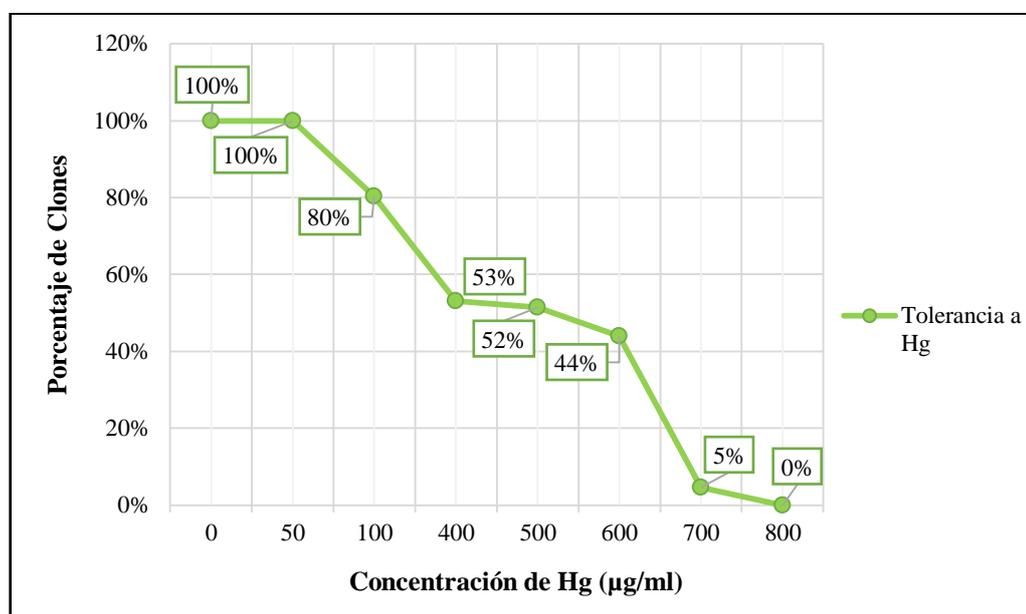


Figura 4-11 Perfil de tolerancia de los clones en presencia de mercurio

Realizado por: NAVARRETE, Vanessa. 2017

El rango de tolerancia alcanzado por los clones en mercurio corresponde a concentraciones de 50 a 700 $\mu\text{g/mL}$, lo que permite confirmar una mejor adaptación de los microorganismos de la presente investigación en comparación a resultados obtenidos en investigaciones similares con porcentajes mínimos de microorganismos con capacidad de tolerancia a mercurio. Rahman & Singh (2016) informan sobre aislados bacterianos con una tolerancia a Hg hasta 100 mg/L y Acevedo & Severiche (2013) aislaron bacterias ambientales que presentaron tolerancia a di-bromo-mercurio en concentraciones de 10 a 180 ppm.

La capacidad de tolerancia que expresan los clones analizados en mercurio, es probablemente atribuible a la elevada presencia de este metal en el agua evaluada ya que se han estudiado comunidades microbianas que se aclimatan a Hg^{+2} induciendo una modificación de su composición fenotípica y genética; conjuntamente la tolerancia a Hg^{+2} en microorganismos adaptados varía en respuesta a diferentes concentraciones del metal al que han sido expuestos y al ambiente en el que se encuentra (Rahman & Singh, 2016, pp.1-2). Es posible que las condiciones a las que fueron expuestos los clones en los aislamientos iniciales lograran el desarrollo de un grupo de bacterias con características particulares de tolerancia a metales pesados entre la población microbiana del ecosistema.

Estudios muestran que la capacidad de resistencia a metales pesados está mediada por una serie de mecanismos que dependen del tipo de microorganismo y de la manera en la que reacciona ante la alteración de su medio, se describen estrategias tales como la exclusión mediante una barrera de permeabilidad, secuestro intracelular y extracelular, una reducción en la sensibilidad de los organelos celulares dirigidos a los iones metálicos, métodos enzimáticos y mecanismos de reducción en conjunto con elementos de transporte activo (Mullick Urmi, 2012, pp.40).

Uno de los mecanismos adaptativos que se presume muestran algunos de los clones en análisis, puede ser justificado por ciertos tonos marrones y grises que adquirieron en los primeros ensayos y que gradualmente fueron desapareciendo a medida que se incrementaba la concentración (Figura 4-12), lo que sugiere que estos cambios de coloración podrían estar asociados con la bioacumulación del metal en la célula mediante la acción de proteínas que facilitan el paso del ion (Hg^{+2}) hasta el citoplasma (Castillo F., 2005, pp. 221-224), en donde puede ser reducido a Hg^0 y volatilizado por acción de enzimas citoplasmáticas (Beltrán & Gómez, 2016, pp. 175).



Figura 4-12 Coloración observada en los clones crecidos en presencia de Hg
Realizado por: NAVARRETE, Vanessa. 2017

4.4.5 Tolerancia a plomo

Los resultados de los ensayos para determinar la capacidad de tolerancia a plomo (Pb^{+2}) se detallan en la Tabla 4-8.

La frecuencia con la que se realizaba cada ensayo dependía del crecimiento que presentaban la mayoría de clones sobrevivientes, los cuales mostraron un buen desarrollo entre 24 a 48 horas hasta el ensayo E6; no obstante, al incrementar las concentraciones del metal en el medio se incrementó también el tiempo necesario para que los clones que aún toleraban el metal adquiriesen un tamaño representativo como para poder ser repicados en la concentración siguiente, por lo que a partir del ensayo E7 fue preciso esperar un intervalo de hasta 120 horas para observar crecimiento.

Tabla 4-8. Ensayos de tolerancia a plomo.

Clon	Concentración de Pb ($\mu\text{g/mL}$)									
	<i>E1</i>	<i>E2</i>	<i>E3</i>	<i>E4</i>	<i>E5</i>	<i>E6</i>	<i>E7</i>	<i>E8</i>	<i>E9</i>	<i>E10</i>
	50	100	400	500	800	1200	1500	1800	2000	2100
1	++	++	++	++	++	++	+	-		
2	++	++	++	++	++	+	+	-		
3	++	++	++	++	++	++	+	-		
4	++	++	++	++	++	+	+	-		
5	++	++	++	++	++	++	+	-		
6	++	++	++	++	++	+	+	-		
7	++	++	++	++	++	++	+	-		
8	++	++	++	++	+	-				
9	++	+	-							
10	++	++	++	++	++	+	+	-		
11	++	++	++	++	++	+	+	-		
12	++	++	++	++	++	+	+	-		
13	++	++	++	++	++	+	+	-		
14	++	++	++	++	++	+	+	-		
15	++	++	++	++	++	++	++	+	-	
16	++	++	++	++	++	++	+	-		
17	++	++	++	++	++	++	+	-		
18	++	++	++	++	++	+	+	-		
19	++	++	++	++	++	++	+	-		
20	++	++	++	++	++	++	+	-		
21	++	++	++	++	++	++	+	-		
22	++	++	++	++	++	++	+	-		
23	++	++	++	++	++	++	++	++	+	-
24	++	++	++	++	++	++	+	-		
25	++	++	++	++	++	++	+	-		
26	++	++	++	++	++	+	+	-		
27	++	++	++	++	++	++	+	-		

28	++	++	++	++	++	++	+	-		
29	++	++	++	++	++	++	+	-		
30	++	++	++	++	++	++	+	-		
31	++	++	++	++	++	+	+	-		
32	++	++	++	++	++	++	+	-		
33	++	++	++	++	++	++	++	-		
35	++	++	++	++	++	++	++	++	+	-
36	++	++	++	++	++	++	+	-		
37	++	++	++	++	++	++	+	-		
38	++	++	++	++	++	+	+	-		
39	++	++	++	++	++	+	+	-		
40	++	++	++	++	++	+	+	-		
41	++	++	++	++	++	++	+	-		
42	++	++	++	++	++	+	+	-		
43	++	++	++	++	++	++	+	-		
44	++	++	++	++	++	++	+	-		
45	++	++	++	++	++	+	+	-		
47	++	++	+	-						
48	++	+	-							
49	++	++	++	++	++	++	+	-		
50	++	++	++	++	++	+	+	-		
51	++	++	++	++	++	++	+	+	-	
52	++	++	++	++	++	++	+	-		
53	++	++	++	++	++	++	+	-		
54	++	++	++	++	++	++	++	++	+	-
58	++	+	+	-						
59	++	++	++	++	++	+	+	-		
60	++	++	++	++	++	+	+	-		
62	++	++	++	++	-					
63	++	++	++	++	++	+	+	-		
64	++	++	++	++	++	+	+	-		
65	++	++	++	++	++	++	+	+	-	
66	++	+	-							
67	++	++	++	++	++	++	++	+	-	
68	++	++	++	++	++	++	++	++	+	-
70	++	++	++	++	++	++	+	-		
71	++	++	++	++	++	++	++	++	+	-
72	++	++	++	++	++	+	+			
73	++	++	++	++	-					
CONTROLES										
*K. n	++	++	+	+	-					
*P. a	++	++	++	++	+	-				

"E": ensayo. "++": buen crecimiento. "+": crecimiento. "-": sin crecimiento. *P. a: *Pseudomona aureoginosa*. *K. n: *Klebsiella neumoniae*. Celdas en blanco: ensayos en los que no se realizó repique de los clones.

Realizado por: NAVARRETE, Vanessa. 2017.

En el desarrollo de estos ensayos, se observó un efecto negativo muy bajo sobre la población de clones desde la menor concentración en el ensayo E1, hasta una concentración de 1500 µg/ml de plomo (ensayo E7) en la que se mantuvo el 89% de los clones con vida (Figura 4-14), a partir de

esta concentración se observa una notable inhibición en el crecimiento de los microorganismos, hasta alcanzar la mortalidad absoluta en 2100 $\mu\text{g/ml}$ del metal. El límite de tolerancia alcanzada fue de 2000 $\mu\text{g/ml}$ en Pb con un crecimiento sólo de los clones 23, 35, 54, 68 y 71 (Tabla 4-8), los cuales representan el 8% del total de los clones (Figura 4-13).

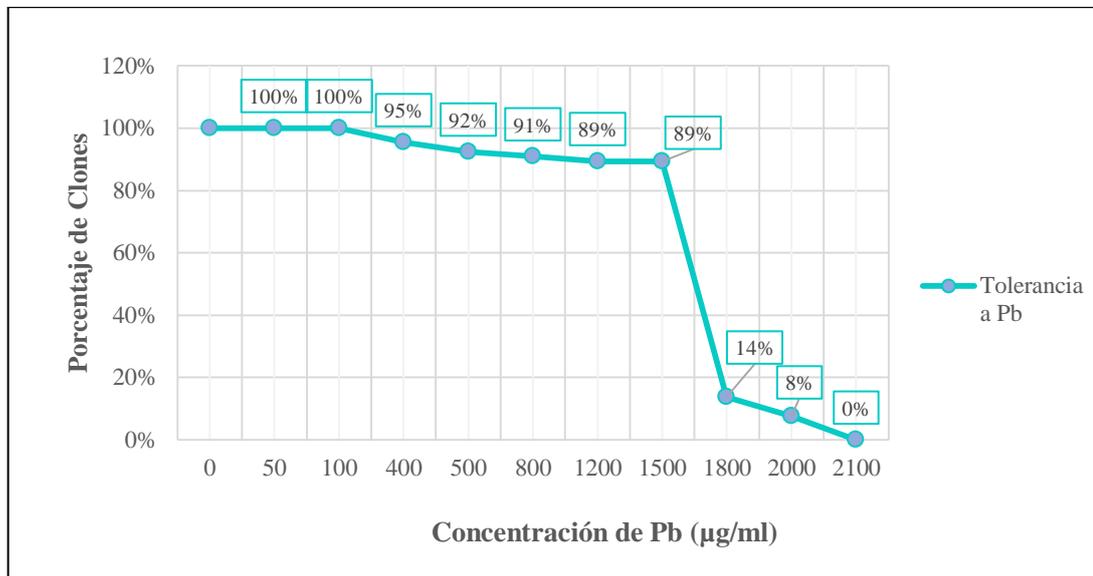


Figura 4-13 Perfil de tolerancia de los clones en presencia de plomo
Realizado por: NAVARRETE, Vanessa. 2017

Los clones analizados exhibieron un límite de tolerancia de 2000 $\mu\text{g/mL}$ en Pb^{+2} (Figura 4-13) comportamiento que se asemeja a lo reportado por Soto *et al.* (2016), quienes lograron aislados ambientales capaces de resistir concentraciones de hasta 1200 mg/L de Pb^{+2} , y por Marzan L. *et al.* (2016), los cuales informaron una resistencia bacteriana contra Pb entre 1800 y 1900 $\mu\text{g/ml}$.

Se han identificado numerosas formas de transformar los metales mediadas por microbios, muchas de las cuales pueden inmovilizar o movilizar metales en el ambiente, transformaciones que a menudo son el resultado del desarrollo de diferentes mecanismos de resistencia que dependen del metal al que se enfrenta el microorganismo (Pandey S. *et al.*, 2013, pp. 13,14). Una de las formas de reducir la biodisponibilidad de metales pesados como plomo, descrita por Maier *et al.* (2009), es mediante la unión con exopolímeros (precipitación extracelular), lo que permiten la inmovilización y adsorción del metal en la superficie de la célula; mecanismo que ciertos clones de la presente investigación pudieron haber desarrollado para lograr su adaptación al medio. Por otro lado, no se descarta la posibilidad de una bioacumulación del metal en bajas concentraciones en el interior del citoplasma por acción de proteínas especializadas como las fitoquelatinas y metalotioneinas (Beltrán & Gómez, 2016, pp. 175) lo cual se evidencia por el cambio en la coloración

de algunos clones, fenómeno que se describió para los clones en los ensayos con mercurio. No obstante, al igual que sucedió con los clones en dichos ensayos, la coloración marrón y grisácea fueron desapareciendo gradualmente a medida que la concentración exterior se incrementaba como se observa en la Figura 4-14. Sin embargo, la toxicidad de metales pesados, resulta en la desnaturalización e inactivación de las enzimas, en la alteración de los orgánulos celulares y en algunos casos, la desintegración de la membrana, por lo que puede existir un presunto bloqueo del microorganismo frente al ion metálico al estar expuesto a concentraciones externas que resultan tóxicas o incluso una saturación del metal en la célula (Mullick Urmi, 2012, pp. 30-31).

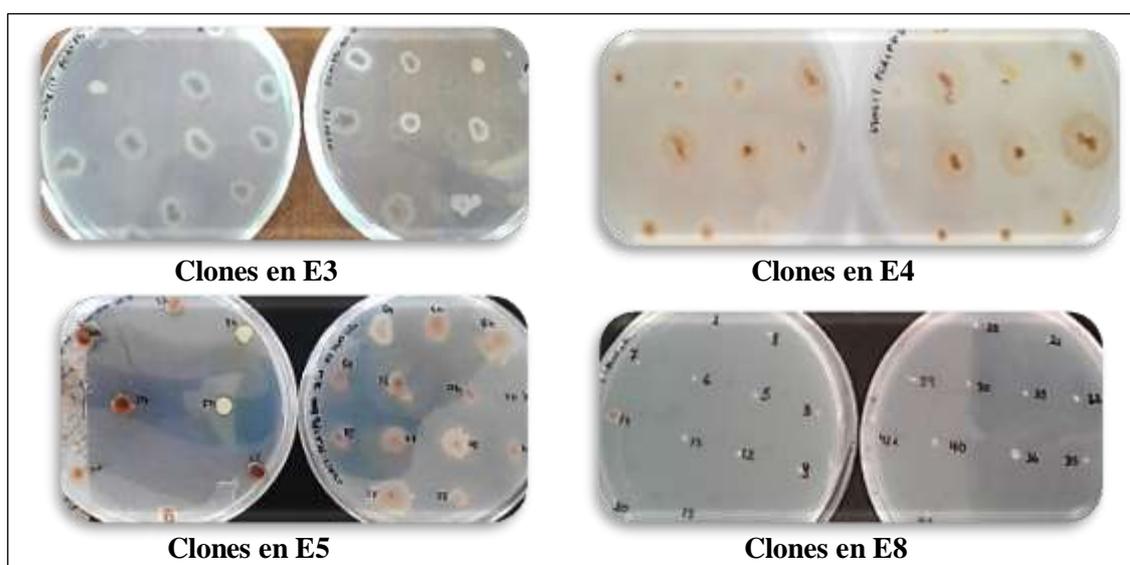


Figura 4-14 Coloración observada en los clones crecidos en presencia de Pb
Realizado por: NAVARRETE, Vanessa. 2017

4.4.6 *Multiresistencia a metales pesados*

Los niveles de tolerancia que registraron los clones analizados en los metales ensayados se determinaron en relación al metal al que fueron expuestos, obteniéndose representantes para cada metal en sus concentraciones máximas.

La evaluación de estos clones mostró multiresistencia en algunos de ellos, haciéndose notar aquellos que resultaron de las concentraciones máximas en los ensayos previo de tolerancia a metales pesados. El clon 28 logró resistir al rango de concentraciones de 50-900 $\mu\text{g/ml}$ en Cr; el cual al exponer nuevamente plomo y mercurio presentó una tolerancia de hasta 700 $\mu\text{g/ml}$ en Hg y 1500 $\mu\text{g/ml}$ en Pb. De igual manera se procedió para las cepas bacterianas de Pb que corresponden a los clones 23, 35, 54, 68 y 71, los cuales fueron repicados en un rango de 500-700 $\mu\text{g/ml}$ en Hg y de 500-800 $\mu\text{g/ml}$ en Cr obteniéndose diferentes respuestas de cada clon para

estos ensayos; comportamiento que se repite en los ensayos para los clones obtenidos de Hg, los cuales fueron sometidos a concentraciones en rangos de 1500-1800 µg/ml de Pb y de 400-500 µg/ml de Cr; entre los cuales se resalta la multiresistencia marcada de los clones 54-Pb, 68-Pb, 71-Pb, 28-Cr, 22-Hg y 70-Hg por la tolerancia que presentaron ante las concentraciones evaluadas en este ensayo. El desarrollo de los clones evaluados se detalla en la Tabla 4-9.

Tabla 4-9. Límite de tolerancia a Pb, Cr y Hg en clones obtenidos.

Clones-Pb						
Metales	Hg (µg/ml)			Cr (µg/ml)		
	[500]	[600]	[700]	[500]	[600]	[800]
23	+	-		-		
35	-			-		
54	+	-		+	-	
68	++	+	-	++	-	
71	++	+	-	+	+	-

Clones-Cr					
Metales	Hg (µg/ml)			Pb (µg/ml)	
	[500]	[600]	[700]	[1500]	[1800]
28	+	+	-	+	-

Clones-Hg				
Metales	Cr (µg/ml)		Pb (µg/ml)	
	[400]	[500]	[1500]	[1800]
22	+	-	++	+
52	-		++	+
70	+	-	+	-

“+”: 0,1 – 0.3 cm. “++”: 0,4 – 06 cm. “-”: sin crecimiento.
 Celdas en blanco: ensayos en los que no se realizó repique de los clones.

Realizado por: NAVARRETE, Vanessa. 2017.

Los resultados obtenidos para el crecimiento de los aislados bacterianos en los diferentes evaluados mostraron un mejor nivel de adaptación a medios suplementados con Pb, seguidos por Cr y finalmente el Hg; según lo descrito por Banjerdkij *et al.* (2003), la mayoría de los microorganismos tienen una propiedad inherente de resistencia a metales, sin embargo, muchos de ellos han desarrollado este rasgo debido a su exposición a metales pesados en ambientes contaminados con éstos, siendo entre otras razones, uno de los mecanismos de adaptación en los clones aislados para los casos de tolerancia a cromo y mercurio del presente estudio. A pesar de no existir trazas de plomo en el agua residual analizada, los clones muestran aclimatación a este metal, lo que posiblemente se debe a que el plomo no influye directamente con ciertas funciones biológicas del desarrollo celular, en adición, es importante tener presente que las bacterias resistentes a un metal en particular pueden adquirir resistencia a otros metales pesados (De Souza *et al.*, 2006). Resultados reportados por otros autores para la resistencia al Pb en aislados bacterianos

del Ecuador, muestran al igual que en este estudio, que este metal posee el menor efecto tóxico sobre la microbiota (Rodríguez L. 2017), lo que nos hace suponer que este hallazgo puede deberse a que en el ambiente existe la presencia de Pb o de algún factor que induciría a la selección de bacterias capaces de tolerar altas concentraciones de este metal.

Ciertamente, las bacterias han desarrollado una variedad de mecanismos de resistencia para contrarrestar el estrés generado por el metal pesado, algunos están mediados por la información genética transportada en plásmidos y tienden a ser específicos para un metal en particular, sin embargo otros mecanismos son generales y confieren resistencia a una variedad de metales (Alam *et al.*, 2011), como los que se presume que han desarrollado los clones de la presente investigación; en este sentido, la habilidad de resistencia a metales pesados que presentan los clones aislados es significativo para posteriores estudios de tratamientos de aguas residuales y procesos de biorremediación o recuperación de metales.

4.4.7 Evaluación de la capacidad de crecimiento a 10°C, 20°C y 35°C

Se realizaron pruebas para evaluar el crecimiento de los clones aislados a diferentes temperaturas, con el fin de determinar la capacidad de adaptación que presentan frente a los metales evaluados anteriormente (Pb, Hg, Cr). Se realizaron controles en PCA sin metal, en un rango de tiempo de 24 a 96 horas.

Se trabajó con algunos de los clones que lograron crecer en los medios suplementados con concentraciones de 1500 ppm de Pb y de 500 ppm de Hg y Cr en los ensayos de tolerancia a metales pesados, concentraciones con las que se realizó esta evaluación (Tabla 4-10). Se remarca el comportamiento que presentaron los clones resultantes de las concentraciones máximas correspondientes a cada metal como se observa en la Tabla 4-10.

Tabla 4-10. Capacidad de crecimiento a 10°C, 20°C y 35°C, en medios con metales y en medio PCA.

PRUEBAS DE TEMPERATURA														
METAL	TIEMPO		24 H			48 H			72 H			96 H		
	TEMPERATURA		10°C	20°C	35°C									
Cr	Cr [500]	28	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+	+++	++
	PCA	28	+/-	+	+/-	+/-	++	+	+	++	++	++	+++	+++
	Cr [500]	39	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-

	PCA	39	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	+	+	-	+	+
	Cr [500]	64	-	+/-	+/-	-	-	+/-	-	-	+	-	-	+
	PCA	64	-	-	-	+/-	-	-	+	-	-	+	-	-
Hg	Hg [500]	23	-	+/-	+/-	-	+	+/-	+/-	++	+/-	+	+++	+
	PCA	23	+/-	+	+	+/-	+	++	+	++	++	++	+++	+++
	Hg [500]	24	-	-	-	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-
	PCA	24	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	+	+
	Hg [500]	26	-	-	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	+	+	-
	PCA	26	-	+/-	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	+	+	-
	Hg [500]	50	-	-	+/-	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	+	+
	PCA	50	-	-	+/-	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	+	+
	Hg [500]	52	-	+	+/-	-	+	+/-	-	++	+	+/-	+++	++
	PCA	52	+/-	+	+	+/-	+	++	+	++	++	++	+++	+++
	Hg [500]	70	-	-	-	+/-	-	-	+/-	-	-	+/-	+/-	-
	PCA	70	-	+/-	+/-	+/-	+	++	+	++	++	++	+++	+++
	Hg [500]	71	-	-	-	+/-	-	-	+/-	+/-	+/-	+	+	+
	PCA	71	-	-	+/-	+/-	-	-	+/-	+/-	+/-	+	+	+
	Hg [500]	73	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-
PCA	73	-	+/-	-	-	+/-	-	-	+/-	-	-	+/-	-	
Pb	Pb [1500]	3	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+	+	+
	PCA	3	+/-	+/-	+/-	+	++	++	+	++	++	++	+++	+++
	Pb [1500]	15	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+
	PCA	15	+/-	+	+/-	+	++	+	+	++	++	++	+++	+++
	Pb [1500]	23	-	-	-	-	+/-	-	-	+/-	+/-	-	+	+
	PCA	23	-	+	+/-	-	++	+	+/-	++	++	+	+++	+++
	Pb [1500]	30	+/-	+/-	+/-	+	+	+/-	+	+	+	+	++	++
	PCA	30	+/-	+	+/-	+	++	+	+	++	++	++	+++	+++
	Pb [1500]	54	-	+/-	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	++
	PCA	54	-	+	+/-	+	++	++	+	++	++	++	+++	+++
	Pb [1500]	33	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+/-	+	+	+	++	++
	PCA	33	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	++	++	++	+++	+++	+++
	Pb [1500]	35	-	+/-	-	-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+	+	+
	PCA	35	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+	++	++	++	+++	+++
	Pb [1500]	62	-	+/-	-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+
	PCA	62	-	+	+/-	+/-	++	+	+	++	++	++	+++	++
	Pb [1500]	66	-	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+	+	+	++	++
	PCA	66	+/-	+	+/-	+	++	+	+	++	++	++	+++	+++
	Pb [1500]	68	-	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+
	PCA	68	-	+	+/-	+/-	++	+	+/-	++	++	+	+++	+++
Pb [1500]	71	-	-	-	-	-	+/-	+/-	+/-	+	+	+	++	
PCA	71	-	+	+/-	+/-	++	++	+	++	++	++	+++	+++	
Pb [1500]	73	-	-	-	-	-	+/-	+/-	+	+	+	+	++	
PCA	73	-	+	+/-	+/-	++	++	+	++	++	++	+++	+++	

“-”: sin crecimiento. “[]”: concentración µg/ml. “+/-”: <0,1cm. “+”: 0,2-0,4 cm. “++”: 0,5-0,9 cm. “+++”: >1cm.

Realizado por: NAVARRETE, Vanessa. 2017.

Los resultados del crecimiento de cada cultivo bacteriano a diferentes temperaturas, fueron expresados según la medición del diámetro que presentaba cada clon, estableciendo una nomenclatura de “+/-” para diámetros menores a los 0,1 cm, “+” para diámetros de 0,2 a 0,4 cm, “++” para diámetros de 0,5 a 0,9 cm y “+++” para diámetros mayores a 1cm, el cual presentaron algunos clones al cabo de las 96 horas.

El desarrollo que presentaron los clones analizados en las 3 temperaturas evaluadas varió de acuerdo al metal al que fueron expuestos. En las primeras 24 horas se observó un crecimiento casi nulo por parte de los clones a 10°C tanto en los medios con Cr, Hg y Pb como en sus controles, mientras que a las temperaturas de 20°C y 35°C se evidenció un crecimiento menor a 0,1 cm de los clones en los medios descritos. En el transcurso de las pruebas, se registraron variaciones marcadas en la morfología de los clones, específicamente en su tamaño, expresado de acuerdo a la temperatura y medio al que fueron expuestos. A las 96 horas el 65,4% de clones mostraron crecimiento a 10°C y el 80,8% a 20 y 35°C, en los medios suplementados con metales pesados.

Los resultados individuales en los medios con cada metal se representan en la Figura 4-15; en donde se observan porcentajes equilibrados de clones con capacidad de crecimiento en Pb (1500 µg/ml) a las 3 temperaturas.

En cuanto a los ensayos en Hg (500 µg/ml) se obtuvo un mayor porcentaje de clones (77,8%) que crecen a 20°C, un 55,6% de clones lograron un desarrollo a 10°C y 66,7% de clones mostraron crecimiento a 35°C.

En los medios con Cr (500 µg/ml), el 25% de los clones presentaron crecimiento a los 10°C; 50% y 70% de los clones crecieron a 20°C y 35°C respectivamente, sin embargo, el clon 28 presentó un desarrollo progresivo en las 3 temperaturas evaluadas, con la particularidad de un mejor crecimiento a 20°C frente a Cr (Tabla 4-10).

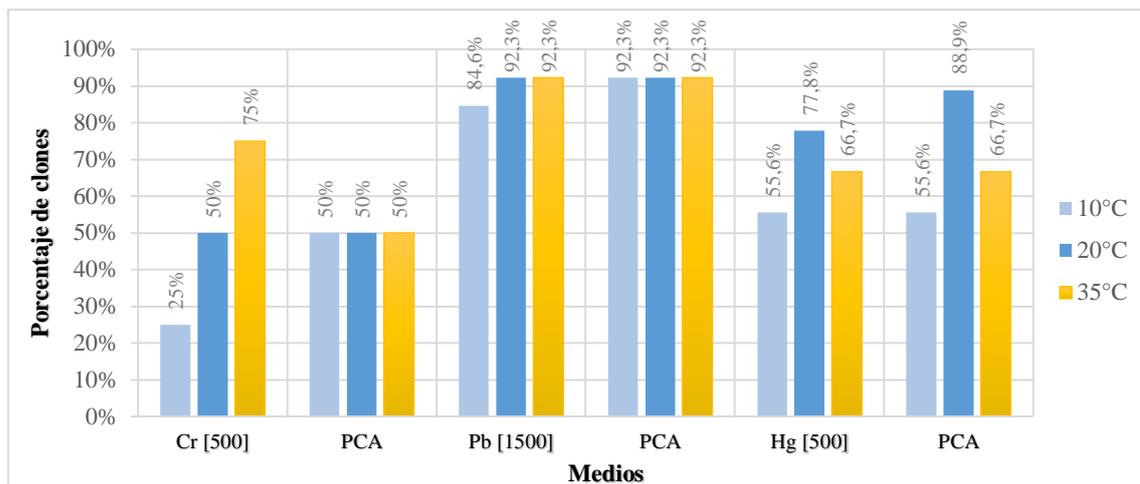


Figura 4-15 Porcentajes de crecimiento de clones evaluados a diferentes temperaturas en medios con y sin metales a las 96 horas.

Realizado por: NAVARRETE, Vanessa. 2017

Con excepción de los clones 28-Cr, 23-Hg, 26-Hg y 62-Pb, que mostraron un mejor crecimiento a 20°C en presencia del metal, las mejores tasas de crecimiento se observaron a 35°C o a 20° y 35°C simultáneamente.

La evaluación de crecimiento a 10, 20 y 35 °C, mostró que la mayoría de los clones puede crecer en las temperaturas estudiadas, lo que demuestra la plasticidad que presentan estos clones para adaptarse a diferentes condiciones ambientales, en este caso de temperatura; característica de importancia para procesos de biorremediación en zonas contaminadas que presentan temperaturas variables.

4.5 Identificación bacteriana

Sobre los nueve clones que mostraron mayores valores de tolerancia a los metales pesados evaluados, se procedió a realizar su identificación mediante una serie de pruebas bioquímicas, las cuales permitieron una identificación presuntiva de los géneros microbianos aislados, comparándolos con la descripción estándar del Manual de Bergey sobre bacteriología determinativa (2000), Diagnostico Microbiológico de Koneman (2008.) y demás bibliografía. Los aislamientos se identificaron hasta el nivel de género y en ciertos casos hasta el nivel de especie; obteniendo como resultado bacterias de los géneros *Moraxella*, *Enterobacter*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Kurthia* y *Citrobacter*.

A partir de los clones resultantes de las máximas concentraciones en los ensayos de tolerancia a mercurio, se identificaron microorganismos del género *Moraxella* spp. (Tabla 4-11), los cuales correspondieron a un 72,7 % de las características descritas por Koneman *et al.* (2008. pp. 333-335) para el género *Moraxella*, con relación al número total de pruebas realizadas.

De los 5 clones obtenidos de la máxima concentración en plomo, 2 presentaron características bioquímicas relacionadas con el género *Citrobacter*, dentro de los cuales se presume las especies *Citrobacter farmeri* y *Citrobacter werkmanii* (Tabla 4-11), con un 77,8% y 88,9% de correspondencia, respectivamente (Manganello *et al.* 2001), los demás expresaron metabolismos relacionados con los géneros *Enterobacter aerogenes* (82%), *Micrococcus* (72,7%) y *Staphylococcus haemolyticus* (81,8%) (McFaddin, 2003. pp. 54, 397), obteniendo un representante para cada género (Tabla 4-11). Mientras que el clon resultante de la máxima concentración en los ensayos de tolerancia a cromo; manifestó caracteres fisiológicos indicativos del género *Kurthia variabilis* (Tabla 4-11) (Stackebrandt *et al.* 2006).

Tabla 4-11. Resultados de la identificación bioquímica de clones finales.

CLONES	Géneros encontrados
28-Cr	<i>Kurthia variabilis</i>
22-Hg	<i>Moraxella</i> spp
52-Hg	<i>Moraxella</i> spp
70-Hg	<i>Moraxella</i> spp
23-Pb	<i>Citrobacter farmeri</i>
35-Pb	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>
54-Pb	<i>Citrobacter werkmanii</i>
68-Pb	<i>Enterobacter aerogenes</i>
71-Pb	<i>Micrococcus</i>

Realizado por: NAVARRETE, Vanessa. 2017.

Los géneros bacterianos registrados en el presente estudio, se asemejan a los reportados en anteriores investigaciones sobre tolerancia a metales pesados con bacterias aisladas de efluentes contaminados con metales pesados; encontrando géneros bacterianos como *Staphylococcus*, *Micrococcus* y *Enterobacter*, a los cuales se los asocia con el desarrollo de mecanismos de resistentes a diferentes metales pesados. (Alam *et al.*, 2011), (Mullick, 2012.). Los géneros mencionados son constantes, al igual que el género *Kurthia*, en aislados a partir de pieles sin curtir, y pieles en diferentes etapas del proceso de elaboración del cuero, fundamentos que permiten respaldar los datos obtenidos (Lama, A., 2010).

4.6 Evaluación de resistencia a antibióticos

Los clones bacterianos identificados fueron sometidos a pruebas de antibióticos para comprobar su sensibilidad o resistencia frente a tres antibióticos: ampicilina (AM), tetraciclina (TE) y gentamicina (CN) mediante el método de difusión con discos. La resistencia o sensibilidad de los clones evaluados fue determinada de acuerdo al diámetro de inhibición formado en cada bacteria frente a los antibióticos ensayados (Sacsquispe & Velásquez, 2002. pp. 20-44).

Todos los clones analizados mostraron alta sensibilidad a gentamicina y tetraciclina, siete de los nueve aislados (77,8%) presentaron resistencia a ampicilina, patrones que se detallan en la Tabla 4-12.

Tabla 4-12. Resultados de antibiogramas de clones identificados.

CLONES		ANTIBIÓTICOS					
		CN [10]		AM [10]		TE [30]	
		diámetro (mm)		diámetro (mm)		diámetro (mm)	
<i>Kurthia v.</i>	28-Cr	30	S	--	R	18	S
<i>Moraxella spp</i>	22-Hg	30	S	30	S	34	S
<i>Moraxella spp</i>	52-Hg	30	S	30	S	36	S
<i>Moraxella spp</i>	70-Hg	23	S	11	R	23	S
<i>Citrobacter f.</i>	23-Pb	26	S	--	R	28	S
<i>Staphylococcus h.</i>	35-Pb	23	S	--	R	27	S
<i>Citrobacter w.</i>	54-Pb	25	S	--	R	34	S
<i>Enterobacter</i>	68-Pb	25	S	--	R	27	S
<i>Micrococcus</i>	71-Pb	22	S	--	R	25	S
TOTAL							
S		100%		22,2%		100%	
R		0%		77,8%		0%	

"[]": concentración µg. "CN": gentamicina. "AM": ampicilina. "TE": tetraciclina.

"S": sensible. "R": resistente. "--": no presenta halo. "mm": milímetros.

Realizado por: NAVARRETE, Vanessa. 2017.

Un número sustancial de estudios ha reportado la incidencia de resistencia simultánea a antibióticos y metales pesados en bacterias de diversas fuentes (Martínez *et al.*, 2010), (Verma *et al.*, 2001), (Selvi *et al.* 2012). Al contrario de estos y varios informes similares, la mayoría de los aislados descritos en el presente estudio mostraron sensibilidad a 2 de los antibióticos evaluados, no obstante, los clones *Kurthia* (28-Cr), *Moraxella* (70-Hg), *Enterobacter* (68-Pb), *Micrococos* (71-Pb) *Citrobacter* (54-Pb y 23-Pb) y *Staphylococcus* (35-Pb) comparten en común la resistencia a ampicilina, así como a los metales cromo, mercurio y plomo (Tabla 4-9).

Alam *et al.* (2011), sugieren que la resistencia a antibióticos y metales ocurre simultáneamente cuando los genes implicados en los mecanismos de resistencia se encuentran juntos en el mismo elemento genético, como en un plasmido, patrones que pueden ser expresados ante la influencia ejercida por la exposición a metales pesados en ambientes los cuales podrían dispersarse debido a que algunos son autotransferibles o movilizados horizontalmente a microorganismos que comparten el mismo hábitat. (Roger & Stanier, 1992, pp. 296).

CONCLUSIONES

- La caracterización físico-química del agua de las muestras analizadas, presentó concentraciones de mercurio de 4,3 mg/l, 7,1 mg/l y 2,8 mg/l para las muestras M1, M2 y M3 respectivamente. En cuanto a los niveles de cromo hexavalente, se encontraron concentraciones de 1,34 mg/l en la muestra M1, 9,1 mg/l en la muestra M2 y 3,5 mg/l en la muestra M3. Estos niveles se encontraron sobre los límites máximos establecidos en el Anexo 1 del Libro VI del TULSMA para descargas al sistema de alcantarillado público.
- Se aislaron 96 clones de las muestras del agua residual obtenidas de la Curtiembre Quisapincha, de los cuales se consiguieron reaislar y estabilizar un total de 66 clones acondicionados a los medios con presión selectiva.
- La evaluación del nivel de resistencia de los clones a metales pesados en medios enriquecidos con diferentes concentraciones de mercurio, cromo y plomo; mostró que tres de los clones fueron resistentes hasta una concentración de 700 ppm de mercurio, un clon presentó resistencia hasta 900 ppm de cromo y cinco clones fueron resistentes a plomo hasta 2000 ppm.
- Las pruebas de identificación bioquímicas permitieron reconocer los géneros de los clones con mayor nivel de resistencia a los metales evaluados, obteniendo como resultado bacterias de los géneros *Moraxella*, *Enterobacter*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Kurthia* y *Citrobacter*.
- Los hallazgos en el presente estudio muestran el nivel de resistencia a metales pesados (Cr^{6+} , Pb^{2+} y Hg^{2+}), de los clones aislados, con lo que es posible evidenciar la presencia de bacterias en el agua residual de la curtiembre, que posiblemente han desarrollado una variedad de mecanismos de resistencia para contrarrestar la toxicidad del metal; característica sustancial para otorgar a este tipo de microorganismos un valor académico de investigación y considerarlos como potenciales agentes de biorremediación y/o recuperación de ambientes contaminados.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda continuar con la investigación de bacterias extremófilas con el fin de profundizar los conocimientos sobre la interacción microorganismo – metal y aplicarlos en tratamientos biotecnológicos de ambientes contaminados con metales pesados.
- Ampliar el estudio sobre reducción y remoción de metales pesados haciendo uso de los aislados para comprender de mejor manera los procesos involucrados en los mecanismos de adaptación.
- Utilizar técnicas de biología molecular para afirmar la identificación de los géneros y especies encontradas en la investigación.

BIBLIOGRAFÍA

ACEVEDO, Rosa & SEVERICHE Carlos. "Identificación de bacterias resistentes a di-bromo-mercurio aisladas de sedimentos en playas de Cartagena de Indias, caribe colombiano." *AVANCES Investigación en Ingeniería*. [En línea] 2013, (Colombia). Vol. 10 (2) pp. 73 – 79. [Consulta: 22 de octubre de 2017]. Disponible en: <http://www.unilibre.edu.co/revistaavances/avances-10-2/07-Identificacion+de+bacterias+resistentes+a+dibromomercurio.pdf>

ALAM, M.; AHMAD, S., MALIK, A. "Prevalence of heavy metal resistance in bacteria isolated from tannery effluents and affected soil." *Environmental Monitoring and Assessment*. [En línea] 2011, Vol. 178, pp. 281–291 [Consulta: 23 de octubre de 2017]. DOI 10.1007/s10661-010-1689-8. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10661-010-1689-8>

ALARCÓN, Luis R. & OLIVAS, Evangelina. *Manual de prácticas de Microbiología básica y Microbiología de alimentos. Programa de Nutrición*. 1^{ra} ed. Juárez - México. UACJ, 2001. pp. 14 – 18.

ALEXANDER, Martin. *Biodegradation and biorremediation*. [En línea]. 2^{da} ed. Ithaca – New York: Academic Press, 1999. pp. 377 – 380 [Consulta: 22 de octubre de 2017]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=cugVY4T9wW4C&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

ALLAERT, Corrie & ESCOLÀ, Marta. *Métodos de análisis microbiológicos de alimentos*. [En línea]. 1^{ra} ed. Madrid – España: Díaz de Santos, 2002. pp. 156. [Consulta: 03 de octubre de 2017]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=H9PkmwKdZ0C&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

ANSARI, R. A., QURESHI, A. A. & RAMTEKE, D. S. "Isolation and characterization of heavy-metal resistant microbes from Industrial soil." *International Journal of Environmental Sciences*. [En línea] 2015, Vol.6 (5), pp. 670 – 680. [Consulta: 03 de octubre de 2017] ISSN: 0976 – 4402. Disponible en: <http://www.ipublishing.co.in/ijesarticles/fourteen/articles/volsix/EIJES6063.pdf>

BAILÓN, L., CERVANTES A., & CRUZ, R. *Atlas de Pruebas Bioquímicas para identificar bacterias.* [En línea]. Universidad Nacional Autónoma de México. 2003. pp. 35. [Consulta: 03 de octubre de 2017]. Disponible en: https://www.academia.edu/4858992/Atlas_de_pruebas_bioquimicas_para_identificar_bacterias

BAKIYARAJ R., BASKARAN L., CHIDAMBARAM A.L., MAHAKAVI T., & SANTHOSHKUMAR M. "Bioremediation of Chromium by *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*" *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* [En línea] 2014 (India), Vol.3(9) pp. 715-719 [Consulta: 12 octubre 2017]. ISSN: 2319-7706. Disponible en: <https://www.ijcmas.com/vol-3-9/R.Bakiyaraj,%20et%20al.pdf>

BANJERDKIJ, P., VATTANAVIBOON, P. & MONGKOLSUK, S. "Cadmium-induced adaptive resistance and cross-resistance to zinc in *Xanthomonas campestris*." *Curr. Microbiol.* 2003. 47, pp. 260-262.

BATOOL, Rida; KIM, Yrjälä, & SHAHIDA, Hasnain. "Hexavalent Chromium Reduction by Bacteria from Tannery Effluent." *Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2012, Vol.22 (4), pp. 547–554. [Consulta: 28 octubre 2017]. DOI: 10.4014/jmb.1108.08029. ISSN: 1738-8872. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Rida_Batool/publication/224845793_Hexavalent_Chromium_Reduction_by_Bacteria_from_Tannery_Effluent/links/551410c60cf2eda0df303e78/Hexavalent-Chromium-Reduction-by-Bacteria-from-Tannery-Effluent.pdf

BELTRÁN-P. Mayra E. & GÓMEZ-R. Alida M. "Biorremediación de metales pesados Cadmio (Cd), Cromo (Cr) y Mercurio (Hg) Mecanismos bioquímicos e Ingeniería Genética: Una revisión." *Revista Facultad de Ciencias Básicas.* [En línea] 2016 (Nueva Granada), Vol.12 (2), pp. 172-197. [Consulta: 12 octubre 2017] ISSN 1900-4699. DOI: 10.18359/rfcb.2027. Disponible en: <https://revistas.unimilitar.edu.co/index.php/rfcb/article/viewFile/2027/1835>

BENITEZ-CAMPO, Neyla. Producción limpia y biorremediación para disminución de la contaminación por cromo en la industria de curtiembres." *Revista del Doctorado Interinstitucional en Ciencias Ambientales. Ambiente y Sostenibilidad.* 2011, Colombia. Vol.1: pp. 25-31. ISSN: 2339-3122

BERGEY, D. H. [edited by] HOLT, John G., et al. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Philadelphia - USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. pp. 566- 569.

CAMACHO, Diego. “Sistema de Gestión de Riesgos y Salud para el mejoramiento de los procesos de producción en la empresa Curtiembre Quisapincha”. (Tesis) (pre-grado). [En línea] Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ingeniería en Sistemas, Electrónica e Industrial. 2013. pp.73. [Consulta: 28 de octubre 2017] Disponible en:
http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/5729/1/Tesis_t830id.pdf

CAVIEDES, Diego, et al. “Tratamientos para la Remoción de Metales Pesados.” *Revista Ingeniería y Región*. [En línea]. 2015; 13(1). pp. 73-90. [Consulta: 22 octubre 2017]. Disponible en:
<https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwi4kar1xYfXAhWDOCYKHcJVANoQFggxMAI&url=https%3A%2F%2Fdiagonal.unirioja.es%2Fdescarga%2Farticulo%2F5432290.pdf&usq=AOvVaw1yuOAjCuExeEIpSeAhvr7>

CASTILLO, Francisco. *Biotecnología ambiental* 1ra ed. Madrid – España. Editorial Tebar. 2005. pp. 221, 240.

CERVANTES. C.; CAMPOS-GARCÍA, J.; DEVARIS, S.; GUTIÉRREZ, Félix; LOZATAVERA, H.; TORRES, J.C. & MORENO, R. “Interactions of chromium with microorganisms and plants.” *FEMS Microbiology Reviews* [En línea] 2001. 1 (25) pp. 335-347 [Consulta: 23 octubre 2017]. ISSN: 0168-6445. Disponible en:
<https://www.semanticscholar.org/paper/Interactions-of-chromium-with-microorganisms-and-p-Cervantes-Campos-Garc%C3%ADa/1800b92e56cff61cae1496f6ff3a228583c243af>

CHANDRA, Ram. *Advances in Biodegradation and Bioremediation of Industrial Waste*. [En línea] USA – New York: CRC Press. Taylor & Francis Group. 2014. [Consulta: 03 de octubre de 2017]. Disponible en:
https://books.google.com.ec/books?id=mHwZBwAAQBAJ&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

CHÁVEZ PORRAS, Álvaro. “Descripción de la nocividad del cromo proveniente de la industria curtiembre y de las posibles formas de removerlo.” *Revista Ingenierías Universidad de Medellín*. 2010 (Medellín, Colombia). Vol. 9 (17), pp. 41-50.

CHEUNG, K.H. & GU, Ji-Dong. "Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review". *International Biodeterioration & Biodegradation*. [En línea] 2007. Vol. 59 (1): pp. 8-15. [Consulta: 23 de octubre de 2017] DOI:10.1016/j.ibiod.2006.05.002. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096483050600076X>

DAS, Surajit & DASH, Hirak Ranjan. *Handbook of Metal-Microbe Interactions and Bioremediation*. [En línea] USA – New York: CRC Press. Taylor & Francis Group. 2017. [Consulta: 23 de octubre de 2017]. ISBN: 97-814-9-8762-434. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=TvGfDgAAQBAJ&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

DA ROS, Giuseppina. *La contaminación de aguas en Ecuador: una aproximación económica*. 1^{ra} ed. Editorial Abya Yala, 1995 – pp. 135 – 251.

DOMÈNECH, Xavier & PERAL, José. *Química ambiental de sistemas terrestres*. Reverte. 2006, Barcelona. pp. 134 – 150. ISBN: 84-291-7906-2.

ECUADOR. ASAMBLEA NACIONAL. Acuerdo ministerial N°. 028. Libro VI del Texto Unificado de Legislación Secundaria (TULSMA). [En línea] Quito – Ecuador. 2015. pp. 95-100. [Consulta: 03 de octubre de 2017] Disponible en: <http://ecuadorforestal.org/wp-content/uploads/2010/05/Libro-VI-Calidad-Ambiental.pdf>.

ECUADOR. MINISTERIO DE INDUSTRIAS Y PRODUCTIVIDAD, *Sector curtiembre creció un 8,6% entre 2011 y 2012*. [En línea]. Boletín de prensa. 2013. DCS - B092. [Consulta: 23 de octubre de 2017] Disponible en: http://www.industrias.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2013/04/BOL_092_2013.pdf

ECUADOR. GOBIERNO AUTÓNOMO DESCENTRALIZADO PARROQUIAL RURAL DE QUISAPINCHA. *Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial (PD y OT)*. [En línea] 2015. pp. 1-10. [Consulta: 23 de octubre de 2017] Disponible en: <http://gadquisapincha.gob.ec/archivos/PDOT2015.pdf>

ECUADOR. SECRETARÍA NACIONAL DE PLANIFICACIÓN Y DESARROLLO–Senplades, *Plan Nacional para el Buen Vivir 2017-2021, Planificamos para toda una vida*". [En

[línea] Quito – Ecuador. Secretaría Técnica del Sistema Nacional Descentralizado de Planificación Participativa 2017. [Consulta: 14 de octubre de 2017]. Disponible en:
<http://www.planificacion.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2017/07/Plan-Nacional-para-el-Buen-Vivir-2017-2021.pdf>

ECUADOR. TRIBUNAL CONSTITUCIONAL. *Ley Orgánica de Recursos Hídricos, usos y aprovechamiento del agua.* Registro Oficial N° 305 - Segundo Suplemento. [En línea] Quito – Ecuador. 2014. [Consulta: 14 de octubre de 2017]. Disponible en: <http://www.agua.gob.ec/wp-content/uploads/2012/10/LEYD-E-RECURSOS-HIDRICOS-II-SUPLEMENTO-RO-305-6-08-204.pdf>

GUTIÉRREZ, Félix & CERVANTES, Carlos. "Interacciones microbianas con el cromo: mecanismos y potencial biotecnológico." *CONCYTEG.* 2008. 3(37). pp. 21–36.

HASSANIEN M.A. "Atmospheric Heavy Metals Pollution: Exposure and Prevention Policies in Mediterranean Basin." *Environmental Heavy Metal Pollution and Effects on Child Mental Development.* NATO Science for Peace and Security Series C: Environmental Security, [En línea]. 2011, Vol.1. pp. 287-307. [Consulta: 22 octubre 2017] DOI 10.1007/978-94-007-0253-0_17 ISBN: 978-94-007-0253-0. Disponible en: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-0253-0_17

HERNÁNDEZ, A. *Microbiología Industrial.* [En línea]. Editorial Universidad estatal a distancia (EUNED) Costa Rica. 2003. pp. 60-70. [Consulta: 22 octubre 2017] ISBN: 978-9968-31-255-4 Disponible en:
https://books.google.com.ec/books?id=KFq4oEQQjdEC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbg_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

HERNÁNDEZ – SAMPIERI, Roberto, FERNÁNDEZ, Carlos & BAPTISTA, Pilar. *Metodología de la Investigación.* 6^{ta} ed. México D.F. – México: McGraw-Hill / Interamericana Editores 2014, pp. 532-537.

ISLAS-ESPINOZA, Marina & BOJÓRQUEZ-AGUILAR, Rocío. "Bacterias reductoras de Cr+6 y su potencial Biotecnológico." *Rev. Int. Contam. Ambie.* 2011. Vol.27 (3), pp.231-239.

KONEMAN, Elmer, et al. *Diagnóstico microbiológico: Texto y Atlas en color.* [En línea]. 6^{ta} ed. Buenos Aires – Argentina: Médica Panamericana, 2008. pp. 333-335. [Consulta: 03 de octubre de 2017]. Disponible en:

https://books.google.com.ec/books?id=jyVQueKro88C&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

LAMA, Anne. The impact of the leather manufacturing process on bacterial growth. Doctoral thesis. [En línea]. The University of Northampton. 2010. pp.12-45. [Consulta: 23 octubre 2017] Disponible en:

<http://nectar.northampton.ac.uk/3578/1/Lama20103578.pdf>

LIMA E SILVA, Agostinho A. et al. "Heavy metal tolerance (Cr, Ag and Hg) in bacteria isolated from sewage." *Brazilian Journal of Microbiology*. [En línea] 2012, (Brazil – São Paulo) Vol. 43 (4), pp.1620-1631. [Consulta: 23 de octubre de 2017] ISSN 1517-8382. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822012000400047

MACFADDIN, Jean F., *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica*, [En línea] 3^{ra} ed. Buenos Aires – Argentina: Médica Panamericana S.A., 2003. [Consulta: 03 de Octubre de 2017]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=FYWSzy7EjR0C&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

MANGANELLO, S., et.al. "Caracterización y distribución de especies de *Citrobacter* en un hospital universitario." *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2001; Vol.19 (1): pp. 11-14

MARTÍNEZ A., et al. "Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas del río Almendares." *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 2010 (La Habana), Vol. 41 (4), pp. 1-11. ISSN: 2221-2450.

MARZAN, L.; et.al. "Isolation and biochemical characterization of heavy-metal resistant bacteria from tannery effluent in Chittagong city, Bangladesh: Bioremediation viewpoint." *Egyptian Journal of Aquatic Research*. [En línea] 2016. Vol.43 (1), pp. 65–7. [Consulta: 23 octubre 2017] ISSN: 1687-4285. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1687428516300851>

MULLICK, Urmi. Simultaneous removal of Sulphate and Chromium from Tannery Waste using Microbes (Tesis) (maestría). [En línea] National Institute of Technology. Department of Chemical Engineering. Rourkela. 2012. pp.12-45. [Consulta: 12 agosto 2017] Disponible en: http://ethesis.nitrkl.ac.in/3929/1/Urmi_Thesis.pdf

MUSTAPHA, Mohammed & HALIMOON, Normala. "Screening and isolation of heavy metal tolerant bacteria in industrial effluent." *Procedia Environmental Sciences* [En línea]. 2015, (Malaysia) Vol. 30. pp. 33 – 37 [Consulta: 23 octubre 2017] ISSN: 1878-0296. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878029615006003#>

MORETA, M. Red Ambato. Tres ríos son vertederos de contaminantes. *EL COMERCIO*. [En línea]. 2009. [Consulta: 12 agosto 2017] Disponible en:

<http://www.elcomercio.com/actualidad/tres-rios-son-vertederos-contaminantes.html>

PANDEY Sanjeev, BARAI Prabir, & MAITI Tushar. "Influence of heavy metals on the activity of antioxidant enzymes in the metal resistant strains of *Ochrobactrum* and *Bacillus* sp." *Journal of Environmental biology*. [En línea]. 2013, Vol. 34. [Consulta: 12 octubre 2017] ISSN: 0254-8704. Disponible en:

<http://shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/22277/3/thesis%20submitted%20by%20sanjeev%20pandey.pdf>

RAHMAN, Zeeshanur & PALSINGH, Ved. "Assessment of heavy metal contamination and Hg-resistant bacteria in surface water from different regions of Delhi, India." *Saudi Journal of Biological Sciences*. [En línea]. 2016 (King Saud). pp. 1-9. [Consulta: 23 octubre 2017] ISSN: 1319-562. Disponible en:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X16301164#bb0005>

SACSAQUISPE Contreras, Rosa & VELÁSQUEZ Pomar, Jorge. *Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de Disco Difusión - Serie de Normas Técnicas N° 30*. 2002, Lima-Perú: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud. pp. 13-66.

SANKAR Narayan, MRINAL Biswas, Dipak Paul & SAIDUR Rahaman. "Biodegradation potential of bacterial isolates from tannery effluent with special reference to hexavalent chromium" *Biotechnology Bioinf. Bioeng.* [En línea]. 2011, (India), Vol. 1(3) pp.381-386. [Consulta: 12 octubre 2017] ISSN: 2249-9075. Disponible en:

https://www.researchgate.net/publication/259666311_Biodegradation_potential_of_bacterial_isolates_from_tannery_effluent_with_special_reference_to_hexavalent_chromium

SIDDIQEE Mahbul, ISLAM Saiful & RAHMA M. Majibur. "Assessment of pollution caused by tannery-waste and its impact on aquatic bacterial community in Hajaribag, Dhaka".

Stamford Journal of Microbiology. [En línea]. 2012, Vol. 2 (1), pp. 20 – 23. [Consulta: 12 octubre 2017]. ISSN: 2074-5346. Disponible en: <https://www.banglajol.info/index.php/SJM/article/view/15208>

SINGH, Jiwan & KALAMDHAD, Ajay S. "Reduction of Heavy Metals during Composting- A Review". *International Journal of Environmental Protection* [En línea]. Sept. 2012, Vol. 2 (9), pp. 36-43. [Consulta: 12 octubre 2017]. Disponible en: <https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjH86bUmdrXAhUi94MKHS5ZBUAQFggyMAE&url=http%3A%2F%2Fwww.academicpub.org%2FDownloadPaper.aspx%3Fpaperid%3D1134&usg=AOvVaw00Nluns9Cclub2NYQMmHan>

SRIVASTAV, Abhinav K. Chromium removal from tannery industry waste water by fungus. (Tesis) (Maestría). [En línea] Thapar University. Department of Biotechnology and Environmental Sciences. Patiala – Punjab. 2012 [Consulta: 12 agosto 2017] Disponible en: <http://dspace.thapar.edu:8080/jspui/bitstream/10266/2106/3/2106.pdf>

STANIER, Roger Y. et al. *Microbiología*. 2^{da} ed. Editorial Reverté. 1992. Barcelona - España. pp. 17 – 83. ISBN: 84 - 291 - 1868 - 3

SURAJIT, Das & HIRAK, Ranjan Dash, *Handbook of Metal-Microbe Interactions and Bioremediation*. [En línea]. 1^a ed. USA – New York: CRC Press Taylor & Francis Group, 2017. pp. 99-126. [Consulta: 23 de octubre de 2017]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=TvGfDgAAQBAJ&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

TAMIL SELVI, A. et al. "Isolation and Characterization of Bacteria from Tannery Effluent Treatment Plant and Their Tolerance to Heavy Metals and Antibiotics" *ASIAN J. EXP. BIOL. SCI.* [En línea]. 2012, (India). Vol.3 (1). pp. 34 – 41. [Consulta: 23 de octubre de 2017]. ISSN: 0975-5845. Disponible en: [https://www.ajeb.com/vol3\(1\)/6.pdf](https://www.ajeb.com/vol3(1)/6.pdf)

TÉLLEZ M., CARVAJAL Roxs, & GAITÁN, Ana. "Aspectos toxicológicos relacionados con la utilización del cromo en el proceso productivo de curtiembres". *Revista de la Facultad de Medicina - Universidad Nacional de Colombia*. Colombia 2004. Vol. 52 (1) pp.50-61. ISSN: 2357-3848 0120-0011.

THANIKAIVELAN, P. Rao, NAIR, J.R. & RAMASAMI, T. "Recent Trends in Leather Making: Processes, Problems and Pathways." *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2005. Vol.35 (1): pp. 37-79.

TORTORA, Gerard J., FUNKE, Berdell R., CASE, Christine L. *Introducción a la microbiología*. 9^{na} ed. Médica Panamericana: Buenos Aires – Argentina. 2007. pp. 89,114. ISBN: 978-950-06-0740-7.

VERMA, Rashmi & DWIVEDI, Pratima. "Heavy metal water pollution- A case study." *Recent Research in Science and Technology*. [En línea]. 2013, Vol.5 (5), pp. 98-99. [Consulta: 23 octubre 2017] ISSN: 2076-506. Disponible en: <http://www.indiawaterportal.org/sites/indiawaterportal.org/files/17047-46696-1-pb.pdf>

VERMA T., et.al. "Chromate tolerant bacteria isolated from tannery effluent." *Bioresource Technology*. [En línea]. 2001 Vol.78, pp. 31 – 35. [Consulta: 23 octubre 2017]. ISSN: 0960-8524. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852400001681>

WANG Jianlong, CHEN Can. "Biosorbents for heavy metals removal and their future". *Biotechnology Advances*. [En línea]. 2009. Vol. 27 pp. 195–226. [Consulta: 12 octubre 2017]. ISSN: 0734-9750. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/23684881_Biosorbents_for_Heavy_Metal_Removal_and_Their_Future

ZURITA HERDOÍZA, Germán Martín. *Análisis descriptivo de la sustentabilidad económica, social y ambiental de la industria del cuero del Ecuador*. (pre-grado) Universidad San Francisco De Quito, Colegio de Administración y Economía. Quito, Ecuador, 2016. pp. 26 – 34.

ANEXOS

Anexo A: Recolección de las muestras

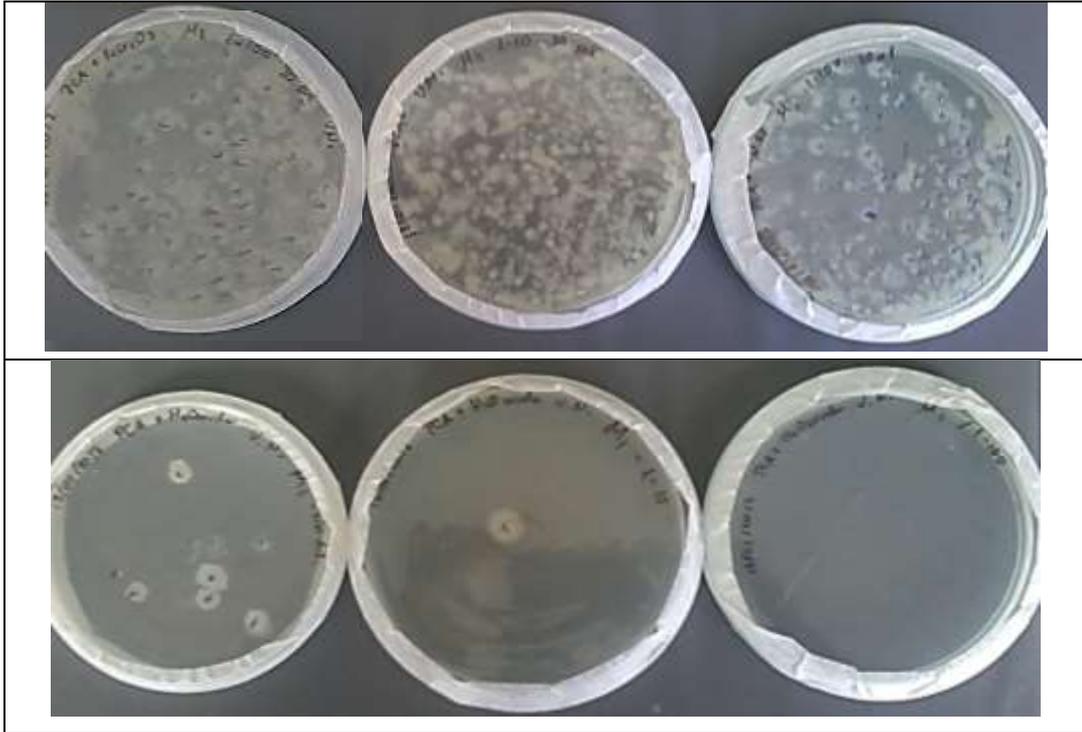


Fotografía 1. Identificación de puntos de muestreo en la Empresa Curtiembre Quisapincha

Anexo B: Siembra y estimación del número de UFC de las muestras

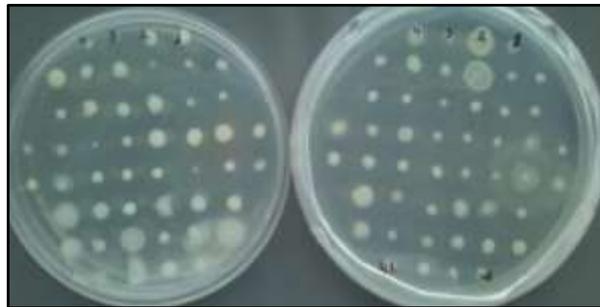


Fotografía 2. Siembra de las muestras con diluciones



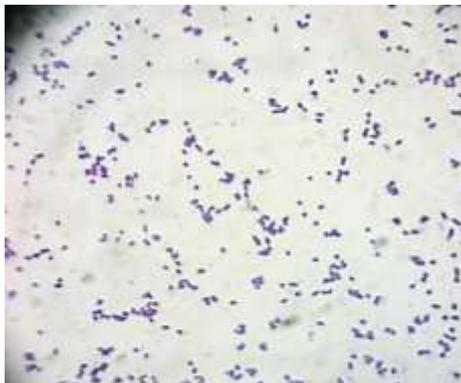
Fotografía 3. Conteo microbiológico de siembras de las muestras con diluciones

Anexo C: Selección y aislamiento de las colonias



Fotografía 4. Repiques

Anexo D: Caracterización de los clones aislados

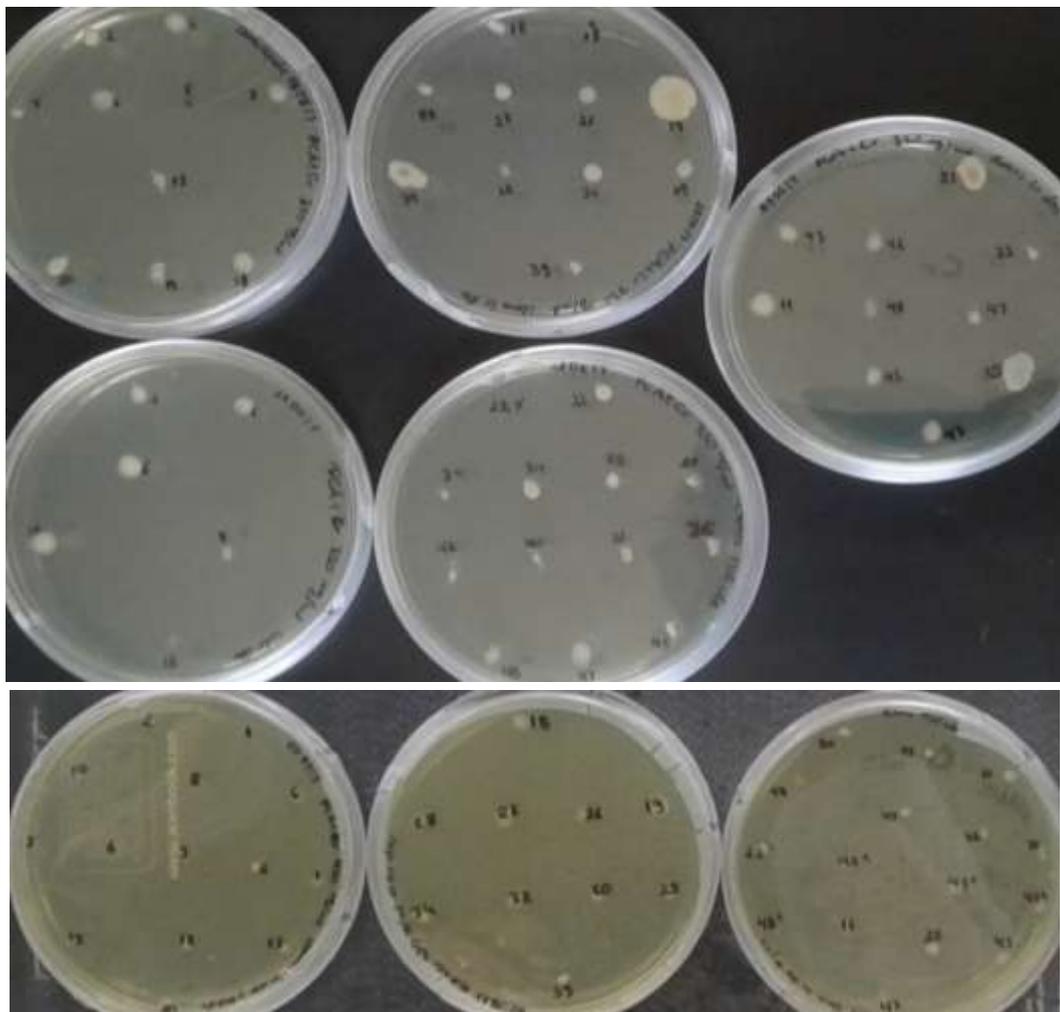


Fotografía 5. Tinción Gram de clones aislados **Fotografía 6.** Tinción Gram de clones aislados

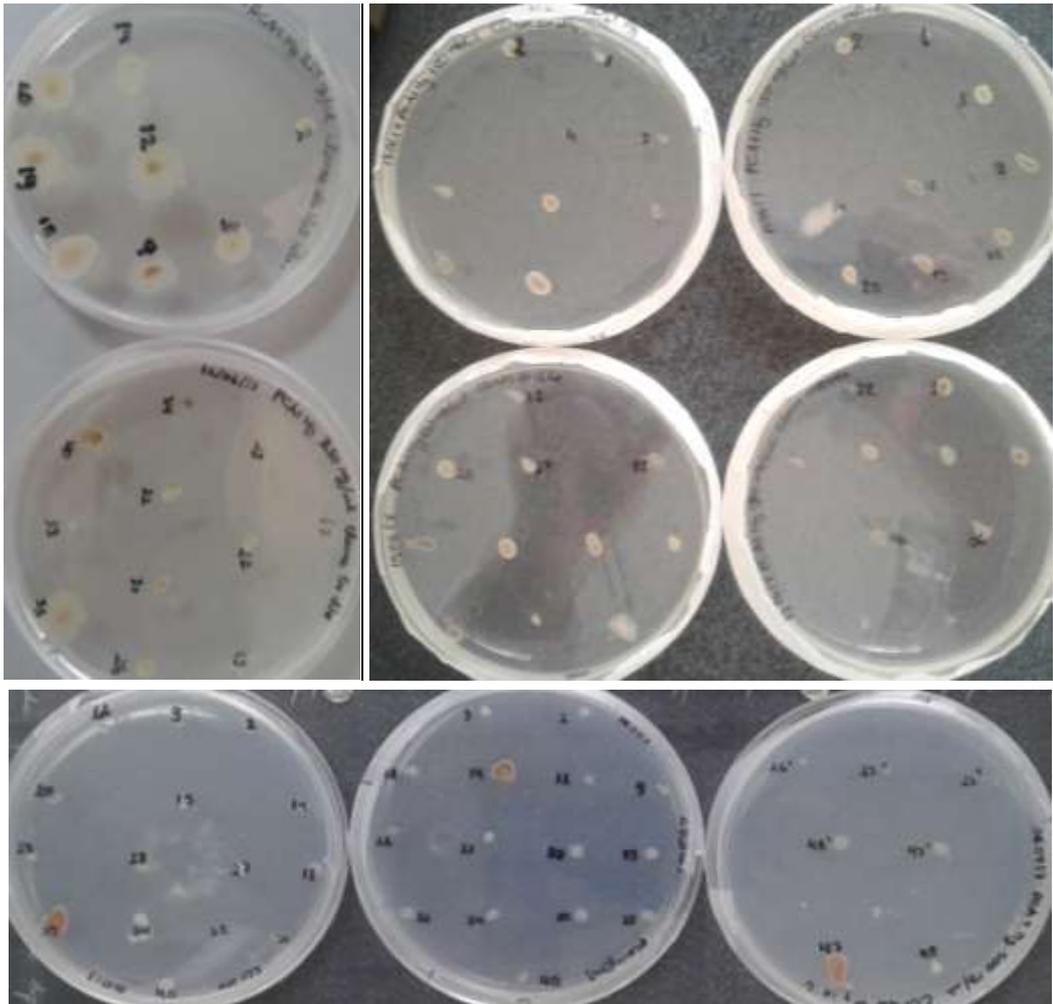
Anexo E: Evaluación de tolerancia a metales pesados de los clones aislados



Fotografía 7. Soluciones de sales de Cr, Hg y Pb



Fotografía 8. Evaluación del desarrollo de los clones aislados en medios con cromo

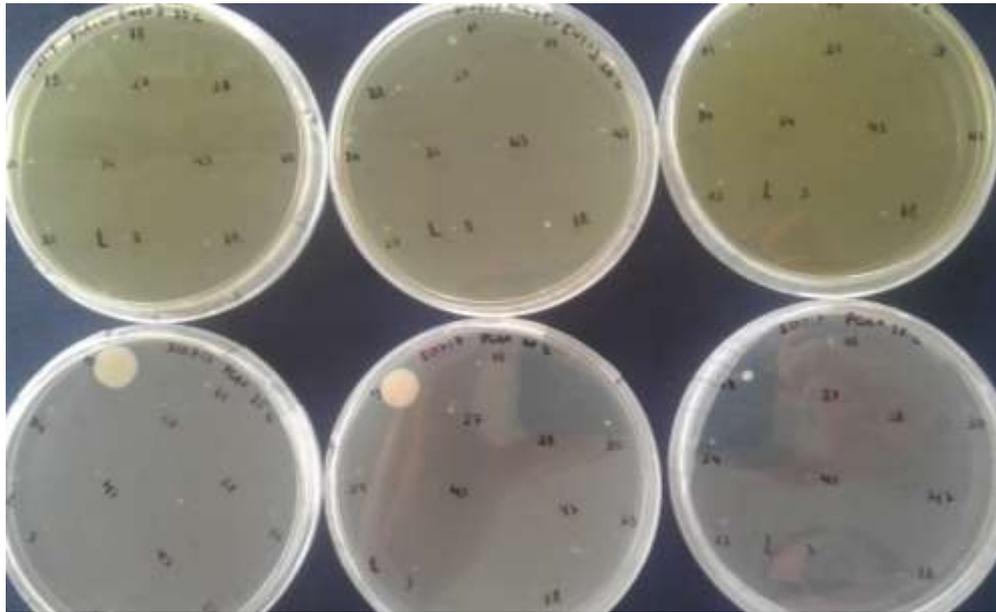


Fotografía 9. Evaluación del desarrollo de los clones aislados en medios con mercurio

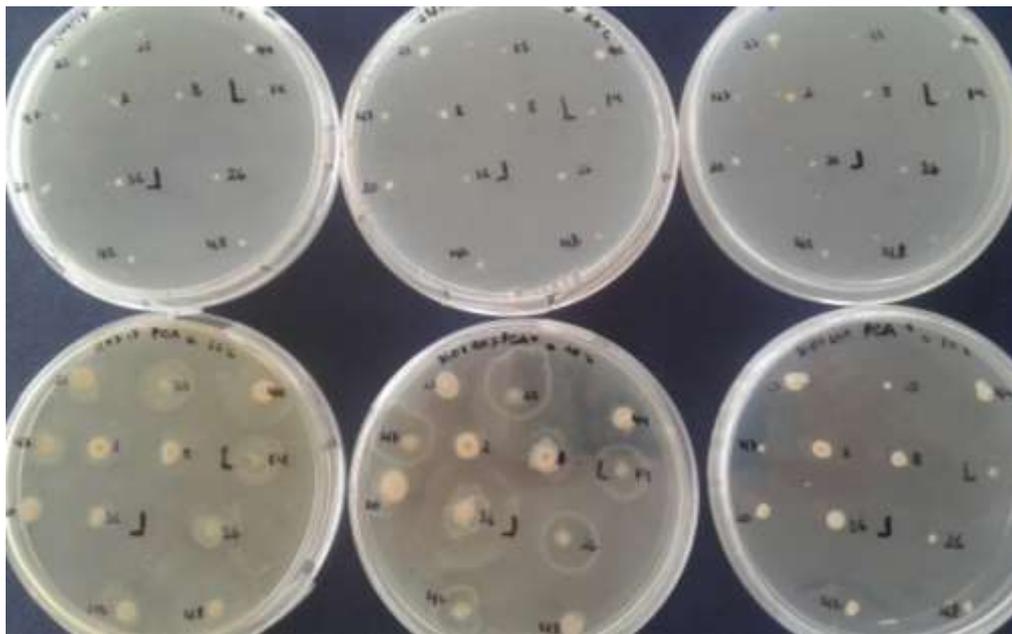


Fotografía 10. Evaluación del desarrollo de los clones aislados en medios con plomo

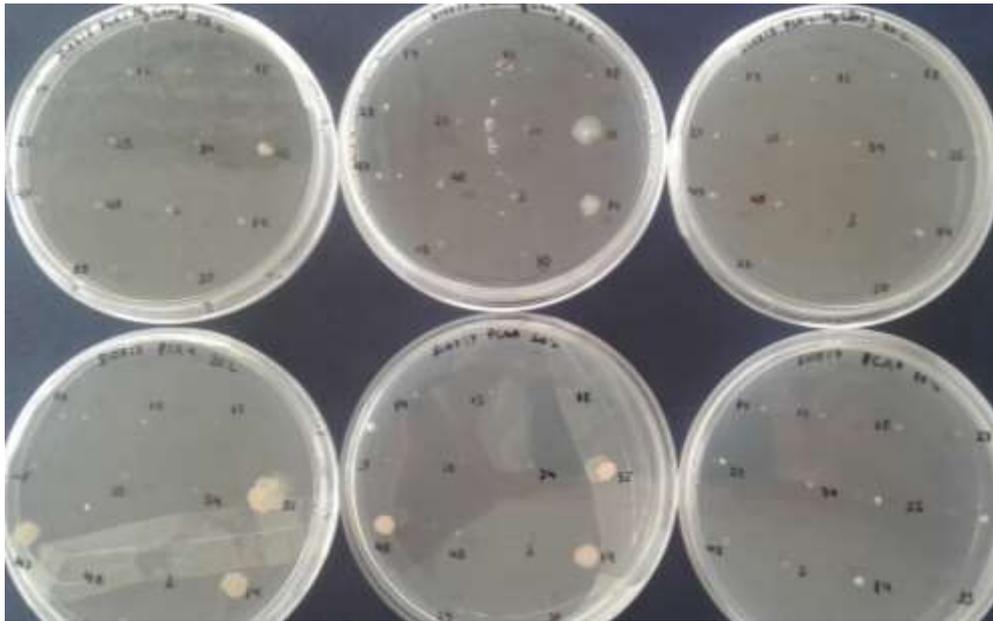
Anexo F: Evaluación de la capacidad de crecimiento a 10°, 20° y 35° C



Fotografía 11. Desarrollo de clones seleccionados a 10°, 20° y 35°C en medios con y sin cromo

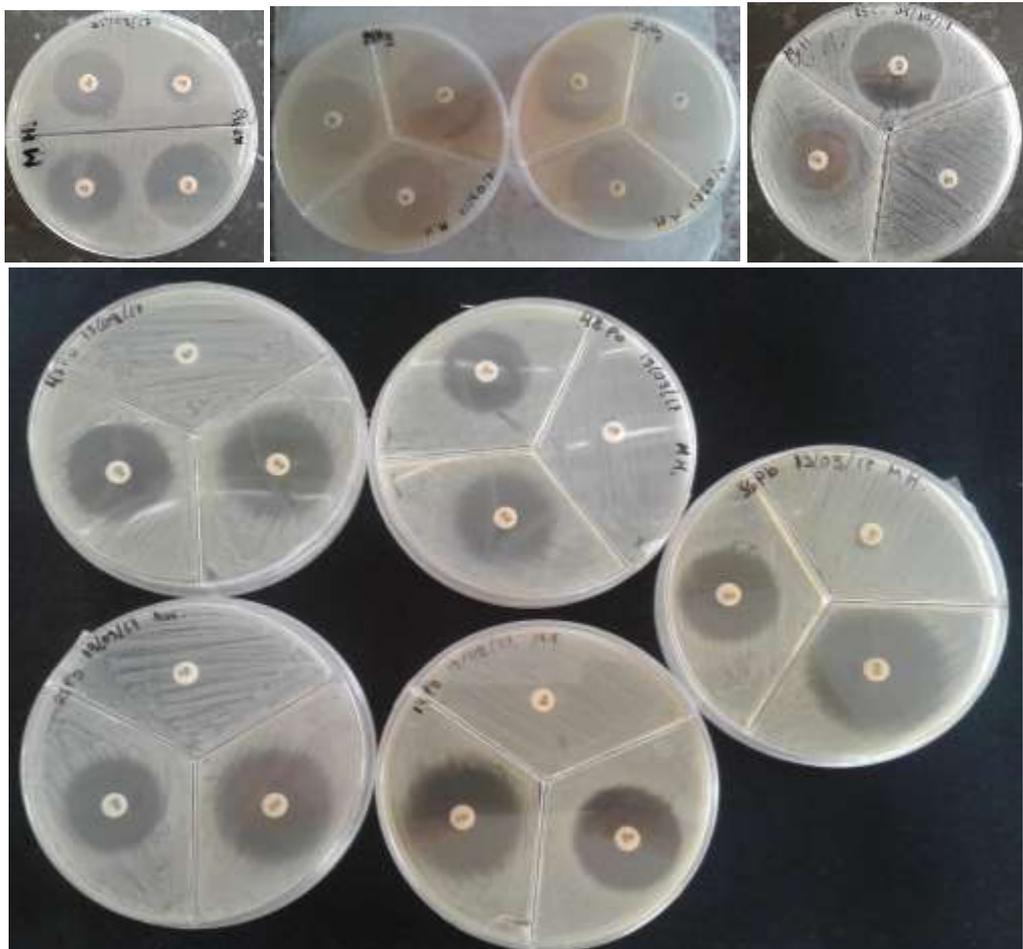


Fotografía 12. Desarrollo de clones seleccionados a 10°, 20° y 35°C en medios con y sin plomo



Fotografía 13. Desarrollo de clones seleccionados a 10°, 20° y 35°C en medios con y sin mercurio

Anexo G: Antibiograma de los clones resultantes de las pruebas de tolerancia a metales pesados



Fotografía 14. Evaluación de la resistencia o sensibilidad a antibióticos de los clones finales