

*REMOCIÓN DE MERCURIO EN AGUAS CONTAMINADAS MEDIANTE  
MICROORGANISMOS TOLERANTES, UNA APROXIMACIÓN A LA  
BIORREMEDIACION MICROBIANA*

JAIME ALBERTO VERA RODRÍGUEZ

UNIVERSIDAD SANTO TOMAS  
FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL  
BOGOTÁ, D.C.

2016

*REMOCIÓN DE MERCURIO EN AGUAS CONTAMINADAS MEDIANTE  
MICROORGANISMOS TOLERANTES, UNA APROXIMACIÓN A LA  
BIORREMEDIACION MICROBIANA*

Presenta:

JAIME ALBERTO VERA RODRIGUEZ

PROYECTO DE GRADO

Para obtener el título de:

INGENIERO AMBIENTAL

Director de proyecto de grado:

RAFAEL GABRIEL BARRAGAN GONZÁLEZ

BIÓLOGO MARINO  
M. SC. MICROBIOLOGÍA

UNIVERSIDAD SANTO TOMAS

FACULTAD DE INGENIERIA AMBIENTAL

BOGOTÁ, D.C.

2016

## 1. RESUMEN

El mercurio es uno de los componentes químicos más tóxicos en el medio ambiente y en general para los seres vivos, debido a esto países alrededor del mundo han prohibido su uso en procesos productivos, ya que el ingreso de este metal a los ecosistemas genera una acumulación a lo largo de la cadena alimenticia. En Colombia más exactamente en la región de la Mojana delimitada por los ríos Cauca, San Jorge y Magdalena que es uno de los ecosistemas más ricos en cuanto a biodiversidad en el mundo, está siendo gravemente afectado por la contaminación por metales pesados especialmente por mercurio debido a la gran explotación de oro en la zona [1], aparte de la región de la Mojana, localmente encontramos el río Bogotá uno de los ríos más contaminados por metales pesados, sólidos suspendidos y baja calidad ambiental en el mundo [2]. En otro nivel, desde su nacimiento hasta su desembocadura en el río Magdalena recibe varias descargas de contaminantes biológicos, químicos y físicos convirtiéndolo así en la alcantarilla más grande de Colombia. Asimismo, tiempo atrás los ríos han estado sometidos a un proceso de contaminación por mercurio, altamente relacionado con la minería del oro ubicada en la proximidad de estos afluentes [2].

Por lo cual es necesario desarrollar localmente una tecnología, encaminada a la remoción del mercurio o de los metales pesados. Actualmente los tratamientos con microorganismos están siendo reconocidos recientemente por la comunidad científica, ya que presentan una alternativa más económica y eficiente a la hora de remover metales pesados con concentraciones mínimas [3]

Para esto se ubicaron en la cuenca alta del río Bogotá en los municipios de Villa Pinzón y Chocontá, para apreciar de cerca la contaminación por mercurio y obtener muestras del ecosistema y así garantizar la obtención de microorganismos tolerantes a esta problemática. Estas muestras fueron suministradas por la profesora Ángela María Jaramillo Londoño del Grupo el grupo investigación de Sostenibilidad Ambiental de la Facultad de Ciencias Ambientales de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (UDCA).

De las muestras procesadas en el presente proyecto se llegaron a obtener 10 Hongos tolerantes al mercurio en medio acuoso, que posterior a pruebas de tolerancia y resistencia, resultaron 6 diferentes cepas de hongos capaces de remover o captar el mercurio en diferentes porcentajes que oscilan entre el 55%-60%.

Se pudo apreciar que los hongos son capaces de tolerar concentraciones grandes de mercurio, aprovechar las rutas metabólicas, la biodiversidad y generar así un nuevo horizonte en Colombia para el tratamiento de aguas y de esta manera se espera que las empresas mineras o las empresas agroquímicas, puedan optimizar sus procesos productivos minimizando así los impactos al ambiente y a la sociedad al poder remover el mercurio de los vertimientos como tratamientos a final del tubo, y por qué no recuperar el mercurio para ingresarlo en sus procesos industriales.

## 2. ABSTRACT

Mercury is one of the most toxic chemicals in the environment and in general for living beings, because of these countries around the world has banned its use in production processes, as the income of this metal to ecosystems generates an accumulation along the food chain. In Colombia more precisely in the region of the Mojana bounded by the Cauca, San Jorge and Magdalena rivers is one of the richest in terms of biodiversity ecosystems in the world, it is being seriously affected by contamination by heavy metals especially mercury due the large gold mining in the area [1], apart from the region of the Mojana, locally found the river Bogotá one of the most polluted rivers by heavy metals, suspended solids and low environmental quality in the world [2]. On another level, from its source to its mouth on the Magdalena River receives several volleys of biological, chemical and physical contaminants thus making it the largest sewer Colombia. Also, some time ago the rivers have been subjected to a process of mercury contamination, highly related to gold mining located in the proximity of these tributaries. [2]

Therefore it is necessary to locally develop technology aimed at the removal of mercury or heavy metals. Conventional treatments could not remove anthropogenic contribution in its entirety, because large volumes of water in which the concentration of metals is of the order of parts per million are handled, which makes it expensive and difficult to remove these metals from water bodies, while treatments with microorganisms being recently recognized by the scientific community as they present a more economical and efficient when removing heavy metals concentrations with minimal alternative. [3]

For this we are located in the upper basin of the river Bogotá in the municipalities of Villa Pinzon and Chocontá, to appreciate closely mercury pollution and obtain samples of the ecosystem and thus ensure obtaining these issue tolerant microorganisms. These samples were provided by Professor Angela Maria Jaramillo Londoño Group on Environmental Sustainability research group of the Faculty of Environmental Sciences at the University of Applied and Environmental Sciences (UDCA).

Of the samples obtained were reached to get 10 Mushroom tolerant mercury in aqueous medium, which after testing tolerance and resistance, were 6 different strains of fungi capable of removing or capture mercury in different percentages ranging between 55% -60 %.

It was seen that fungi are able to tolerate high concentrations of mercury, exploit metabolic pathways, biodiversity and generate a new horizon in Colombia for water treatment and thus it is expected that mining companies or companies Agrochemical, they can optimize their production processes minimizing impacts to the environment and society to be able to remove mercury discharges as treatments at the end of the tube, and why not recover mercury to enter it in industrial processes.

## Contenido

|       |                                                   |    |
|-------|---------------------------------------------------|----|
| 1.    | RESUMEN.....                                      | 2  |
| 2.    | ABSTRACT .....                                    | 4  |
| 3.    | INTRODUCCIÓN .....                                | 11 |
| 4.    | OBJETIVOS .....                                   | 12 |
| 4.1   | OBJETIVO GENERAL.....                             | 12 |
| 4.2   | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                       | 12 |
| 5.    | MARCO DE REFERENCIA .....                         | 13 |
| 5.1   | MARCO CONTEXTUAL.....                             | 14 |
| 5.2   | VILLA PINZÓN .....                                | 14 |
| 5.3   | CHOCONTÁ.....                                     | 14 |
| 6.    | MARCO CONCEPTUAL .....                            | 16 |
| 7.    | MARCO TEÓRICO .....                               | 21 |
| 8.    | DESARROLLO CENTRAL.....                           | 27 |
| 8.1   | METODOLOGÍA.....                                  | 27 |
| 8.1.1 | RECOLECCIÓN DE MUESTRAS .....                     | 27 |
| 8.1.2 | MUESTREO Y ZONA DE INFLUENCIA.....                | 27 |
| 8.2   | SELECCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS.....             | 29 |
| 8.2.1 | EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO. ....             | 29 |
| 8.2.2 | PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO .....        | 29 |
| 8.2.3 | SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS.....                 | 31 |
| 8.2.4 | CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS COLONIAS ..... | 31 |
| 8.2.5 | PRUEBAS DE TOLERANCIA .....                       | 31 |
| 9.    | RESULTADOS OBTENIDOS.....                         | 36 |
| 10.   | DISCUSIÓN Y APLICACIÓN .....                      | 42 |
| 11.   | CONCLUSIONES.....                                 | 47 |
| 13.   | Bibliografía.....                                 | 50 |
| 14.   | Anexos .....                                      | 56 |

## LISTA DE FIGURAS.

|                                                                                         |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: flujo de mercurio pre industrial .....                                        | 17 |
| Figura 2: bioacumulación del mercurio en la cadena trófica marina.....                  | 18 |
| Figura 3: ciclo biogeoquímico del mercurio. ....                                        | 20 |
| Figura 4: zona de influencia rio Bogotá. ....                                           | 28 |
| Figura 5: Biorremediacion de Hg en la Planta Piloto de Agua Residual lodos activados... | 44 |

## LISTA DE TABLAS.

|                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1: Características generales de las tecnologías para la eliminación de metales pesados. .... | 23 |
| Tabla 2: microorganismos capaces de remover metales pesados adición de compuestos químicos. ....   | 24 |
| Tabla 3: microorganismos capaces de remover contaminantes utilizando biopolímeros ..               | 25 |
| Tabla 4: Medios de cultivo para hongos.....                                                        | 36 |
| Tabla 5: Evaluación nutricional de los medios de cultivo para hongos. ....                         | 37 |
| Tabla 6: Caracterización morfológica. ....                                                         | 39 |
| Tabla 7: Resultados de remoción o acumulación por hongos. ....                                     | 42 |
| Tabla 8: precisión de laboratorio. ....                                                            | 57 |

## LISTA DE FOTOGRAFÍAS.

|                                        |    |
|----------------------------------------|----|
| Foto 1: medio solido.....              | 30 |
| Foto 2: medio líquido. ....            | 30 |
| Foto 3: cajas de Petri.....            | 32 |
| Foto 4: prueba de tolerancia. ....     | 33 |
| Foto 5: réplicas en medio líquido..... | 34 |

## LISTA DE ANEXOS.

|                                |    |
|--------------------------------|----|
| Anexo 1: remoción hongo 1..... | 58 |
| Anexo 2: remoción hongo 2..... | 59 |
| Anexo 3: remoción hongo 3..... | 60 |
| Anexo 4: remoción hongo 4..... | 61 |
| Anexo 5: remoción hongo 5..... | 62 |
| Anexo 6: remoción hongo 6..... | 63 |

### 3. INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental generada por diferentes procesos antrópicos, si no es el mayor problema que afecta el medioambiente es de los mayores contribuyentes al desequilibrio de los ecosistemas en la tierra. Los metales pesados son uno de los contaminantes más tóxicos y más difíciles de tratar que se obtienen como salidas de todos los procesos industriales, cabe aclarar que estos metales pesados se encuentran en la corteza terrestre de forma natural pero si su distribución a lo largo de los ecosistemas no es la correcta se convierten en agentes tóxicos para la biota del ecosistema, ocasionado por los procesos de minería, refinería entre otros. [4]

Uno de los metales pesados que afectan más al ecosistema y a la salud de la vida humana es el mercurio. Este metal se puede encontrar de manera natural o por actividades antrópicas como lo es la minería del oro, lo cual ha ocasionado su acumulación y toxicidad en la biota. [1]

Por otra parte, el principal riesgo que presenta el mercurio consiste en que es bioacumulable, afectando principalmente a mujeres embarazadas y a la población infantil, ya que el mercurio al ingresar al organismo actúa como una neurotoxina, afectando el cerebro y el sistema nervioso. [5]

La remoción de metales pesados por medio de procesos tales como el intercambio iónico (resinas) y la adsorción (carbón activado), es una alternativa eficiente; Sin embargo, la utilización de estos materiales convencionales puede resultar prohibitiva en muchas situaciones debido a los altos costos asociados a su adquisición, implementación y operación [6]. Por este motivo se encaminaron a investigar si hongos o mohos, presentes en el ecosistema del río Bogotá podrían aportarnos su capacidad de remoción o capacidad de absorción para sustituir las diferentes resinas o el carbon activado.

Pudimos apreciar que el río Bogotá cuenta con diferentes contaminantes químicos, orgánicos, además de metales pesados como el mercurio (Hg), así que decidimos recolectar muestras del río para buscar si existieran hongos que resistieran estos niveles de contaminación ambiental y aprovechar su capacidad de bioacumulación. [2]

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

- 4.1.1 Evaluar la capacidad de inmovilización de mercurio por diferentes especies microbianas, para su potencial utilización en el tratamiento de aguas residuales.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 4.2.1 Adquirir los microorganismos aptos para el proyecto.
- 4.2.2 Determinar las necesidades de nutrientes de los microorganismos para así mantener la actividad biológica.
- 4.2.3 Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de mercurio sobre las especies seleccionadas.
- 4.2.4 Evaluar la remoción de mercurio por los diferentes microorganismos.

## 5. MARCO DE REFERENCIA

En Colombia se puede apreciar claramente la afectación que el mercurio está generando, la minería artesanal de oro, el uso de pesticidas o fungicidas en procesos de agricultura, como ha sido informado a la comunidad antioqueña por Omar Franco director de recurso hidráulico del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, se han encontrado grandes cantidades del metal, esta contaminación se debe a los diferentes procesos de crecimiento de la población y el aporte de explotaciones mineras artesanales [7].

Los municipios más afectados del bajo Cauca han sido Cáceres, Caucasia, El Bagre, Nechi, Taraza y Zaragoza, donde su actividad económica principal es la minería legal o ilegal de oro; además de este impacto ambiental se puede ver repercusiones en los demás ríos o quebradas al norte del país sin mencionar las afectaciones a la salud y al medio ambiente que este químico produce [8].

Siendo, no menos importante el río Bogotá necesita unos tratamientos sean físico-químicos o de carácter microbiano para que con el pasar de los años y los esfuerzos de las entidades ambientales como: el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible, la Secretaría Distrital de Ambiente, la Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca (CAR) y la Secretaría de Salud; la CAR como responsable pueda entregar a las generaciones futuras el río Bogotá como alguna vez fue en años pasados; en sus cuatro tramos se puede ver claramente cuáles son los problemas o impactos antrópicos que aportan a la baja calidad ambiental del río, en su primer tramo (nacimiento-VillaPinzón) presenta aguas cristalinas, ricas en oxígeno y con baja contaminación, en su segundo tramo (VillaPinzón-Rio Juan Amarillo) se caracteriza por condiciones de contaminación creciente, tanto por las aguas negras como por los vertimientos industriales. Esto ha conducido a una disminución de la diversidad bentónica y un incremento de especies indicadoras de baja calidad ambiental, en su tercer tramo (Rio Juan Amarillo- Tocaima) presenta condiciones sépticas y pestilentes, con grandes riesgos para la salud humana, en su último y cuarto tramo (Tocaima-Rio Magdalena) se ve una baja presencia de oxígeno disuelto debido a la baja velocidad del agua [2].

## 5.1 MARCO CONTEXTUAL

Para explicar más a fondo la problemática que se tiene en el país con respecto a la contaminación hídrica por metales pesados, en el marco contextual se muestran diferentes ejemplos de fuentes hídricas contaminadas, aunque el presente proyecto se realizó en el Río Bogotá, más exactamente en los municipios de Villa Pinzón y Chocontá.

## 5.2 VILLA PINZÓN

Villa Pinzón es un municipio de Cundinamarca (Colombia), ubicado en la provincia de Almeidas, se encuentra a 95 km de Bogotá sobre la Troncal Central del Norte (Ruta 55). Allí se encuentra el nacimiento del río Bogotá, afluente del Magdalena, uno de los más contaminados del mundo después de su paso por Bogotá [9].

Los sectores agropecuario, industrial y medio ambiente, son los que aportan de manera cuantitativa al desarrollo social y económico territorial. Las actividades agrícolas y pecuarias de la región, el sector secundario de la economía, se manifiesta con la presencia y actividad de diferentes establecimientos comerciales que proveen de insumos agrícolas y de elementos de primera necesidad para la canasta familiar de la población Villaponzonense. El tercer sector de la economía en el municipio se encuentra representado por la industria de las curtiembres, en donde procesan el cuero generando empleo y sustento a las familias que allí laboran. Además encontramos en VillaPinzón algunos talleres del cuero donde elaboran manufacturas dándole valor agregado al producto y creándose de manera alterna otra actividad de sustento [9].

## 5.3 CHOCONTÁ

Chocontá, cuyo nombre colonial es Leal y Noble Villa de Santiago de Chocontá, es un municipio de Cundinamarca (Colombia), ubicado en la provincia de los Almeidas, se encuentra a 75 km de Bogotá sobre la Troncal Central del Norte [10].

Limita por el Norte con Villapinzón y Cucunubá, por el Sur con Sesquilé y Machetá, por el Oriente con Machetá y Tibirita, por el Occidente con Suesca [10].

Situada a 75 km de Bogotá, a 20 km de Sesquilé de un ramal en la playa, Machetá a 18 km hacia los llanos orientales ramal en la represa del Sisga, Villapinzón a 14 km vía al norte y Suesca a 22 km [10].

El 70 % de la población de Chocontá se dedica a las actividades agropecuarias, ocupando así el primer renglón de la economía del municipio [10].

El principal producto agrícola y de mayor área sembrada en el municipio de Chocontá, es el cultivo de papa con 850 Ha., su rendimiento se estima entre 15 y 20 toneladas por hectárea (120 – 160 cargas de 10 arrobas cada una), disminuye su producción especialmente durante las épocas en que se presentan las heladas y por la afectación de enfermedades y plagas. La principal enfermedad que ataca a este cultivo es la gota, producida por el hongo *Phytophthora infestans*; entre otras plagas se encuentran el gusano blanco (*Premnotrypes Bórax*), la chiza (*Ancognata scarabaoides*), las pulgillas (*Epitrix spp.*) y la palomilla guatemalteca de la papa [10].

Actualmente los agricultores de la zona disponen de variedades mejoradas altamente resistentes a la gota, que producen altos rendimientos y son de buena calidad; entre ellas se destacan las variedades Parda Pastusa, Diacol Monserrate, Diacol Guadalupe e Ica-Puracé. La variedad más utilizada en el municipio de Chocontá es la Parda Pastusa [10].

Últimamente se ha incrementado también el asentamiento y producción de la industria de las flores que se ha difundido aceleradamente en la región, en el municipio hay un aprovechamiento de 7,7 Ha. para esta actividad. Esta difusión ha producido un gran impacto socio - espacial de características contradictorias, ya que junto al principal impacto positivo que es la generación de empleo directo, están los efectos negativos entre los que se encuentran:

- El aumento en la demanda de vivienda, ha originado el surgimiento de asentamientos subnormales precarios y el incremento de inquilinatos en la cabecera municipal.
- La gran presión sobre el recurso hídrico por el uso intensivo de pesticidas y fertilizantes, los cuales tienen niveles altos de toxicidad capaces de matar, en pequeñas dosis ratas, conejos, peces y personas [10].

## 6. MARCO CONCEPTUAL

Las emisiones antropogénicas de mercurio incluyen tanto puntuales como difusas. Las primeras representan casi el 98% de las emisiones de mercurio estas se pueden asociar a puntos precisos de la geografía y el 2% restante son las emisiones difusas que son más dispersas y no está definido un espacio físico para la fuente, pero a través de modelos sí se puede estimar la posible fuente o punto geográfico exacto de donde se estén llevando a cabo estas emisiones, como se puede apreciar a continuación en la figura 1 [11].

Las fuentes puntuales pueden clasificarse a su vez en tres: fuentes de combustión, fuentes de producción y fuentes diversas [11].

El mercurio existe de manera natural como elemento traza en combustibles fósiles y puede ser igualmente encontrado en materiales de desecho de origen muy diverso. Dada su gran volatilidad y las temperaturas alcanzadas durante la combustión, puede ser fácilmente desechado junto a gases de combustión como contaminante traza, de las cuales las fuentes de combustión más importantes son: calderas, incineradoras, incineradoras de residuos hospitalarios, crematorios [11].

Las fuentes de producción incluyen tanto a aquellas que utilizan el mercurio directamente, como aquellas otras que producen mercurio como subproducto de las cuales se aprecian las más importantes o significativas: industrias cloro-álcali, cementeras, producción de pasta y papel, producción de termómetros y producción secundaria de mercurio [11].

Las fuentes de emisiones difusas hacen parte del 2% aproximadamente y los procesos que inciden en estas emisiones son: plantas de energía geotérmica, pigmentos, catalizadores de mercurio y explosivos [11].

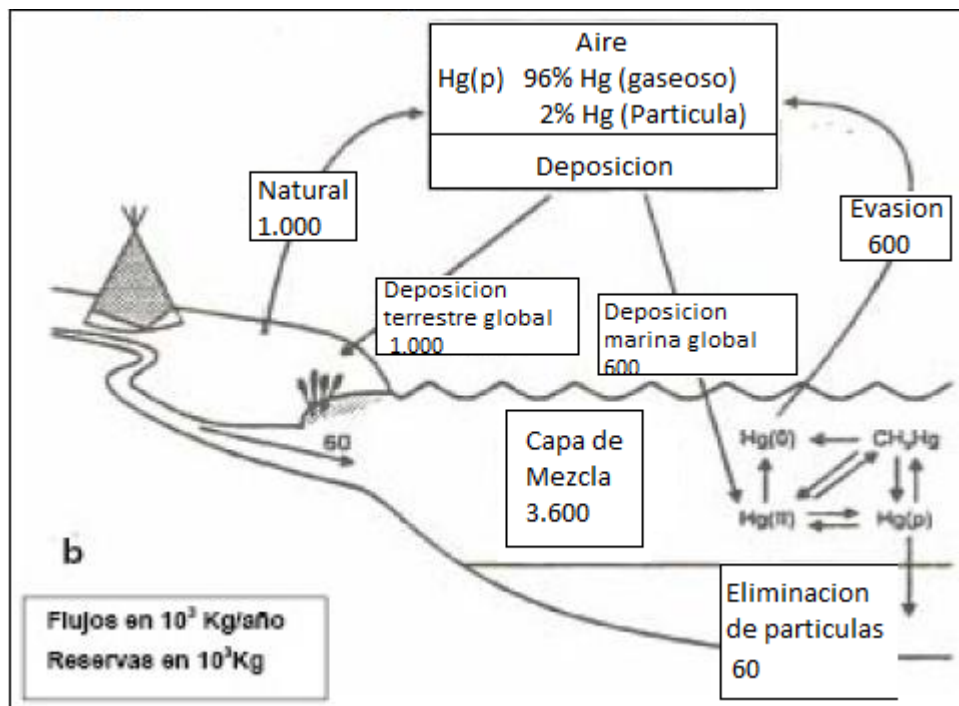


Figura 1: flujo de mercurio pre industrial [11]

El mercurio y sus compuestos son extremadamente tóxicos para los seres humanos y el medio ambiente. En grandes cantidades puede ser mortal, la inhalación de vapor de mercurio es la ruta más importante de penetración del mercurio elemental en el cuerpo humano. Aproximadamente el 80% del vapor de mercurio inhalado es retenido por el organismo. Una vez absorbido, el mercurio elemental es distribuido con facilidad por todo el cuerpo; es capaz de atravesar las barreras sangre placenta y sangre-cerebro. El mercurio elemental es oxidado a mercurio inorgánico divalente vía hidrogeno peroxidasa-catalasa, presente en la mayoría de tejidos. La distribución del mercurio elemental absorbido se encuentra limitada principalmente por la oxidación a mercurio divalente, puesto que este último tiene una movilidad mucho más reducida [12].

La inhalación prolongada de vapores de mercurio puede dar lugar a dolores de pecho, disnea, hemoptisis y en algunas ocasiones neumonitis intersticial que puede ocasionar la muerte. La ingestión de compuestos mercúricos, en particular el cloruro de mercurio, puede causar gastroenteritis ulcerosa y necrosis tubular aguda causando la muerte por anuria en caso de no realizarse diálisis [13]. Incluso en dosis relativamente bajas pueden afectar gravemente el desarrollo de sistemas nerviosos, el sistema central nervioso es el órgano crítico en la exposición de vapores de mercurio, la exposición aguda puede dar lugar a reacciones psicóticas caracterizadas por delirios y tendencias suicidas [5].

La toxicidad para los humanos y otros organismos depende de la forma química, la cantidad, la vía de exposición y la vulnerabilidad de la persona expuesta. Algunas personas son especialmente sensibles y vulnerables a la exposición al mercurio, en particular el feto, el recién nacido y los niños pequeños debido a la sensibilidad del sistema nervioso en desarrollo. Así, los padres, las mujeres embarazadas y mujeres que desean quedar embarazadas sobre todo, deben ser conscientes del daño potencial del metil mercurio. Los límites críticos permisibles para evitar efectos ecológicos por el mercurio en suelos orgánicos se han fijado en 0,07 - 0,3 mg/kg de mercurio total en los suelos[5].

El riñón es el órgano diana en el caso de ingestión de sales de mercurio inorgánico divalente, pudiéndose desarrollar síndromes nefríticos como resultado de una respuesta inmunotóxica [5].

Las glándulas tiroideas pueden acumular mercurio en caso de exposición continua a mercurio elemental [14]. Se ha mostrado que una exposición ocupacional moderada afecta un sistema particular de enzimas de la tiroides a niveles de mercurio en la orina de 15-30 mg/g de creatinina, los mismos niveles son mencionados en los informes sobre los efectos menores en el sistema nervioso central y los riñones [14].

Un factor muy importante de los efectos del mercurio en el medio ambiente es su capacidad para acumularse en organismos y ascender por la cadena alimentaria, como se puede apreciar a continuación en la Figura 2.

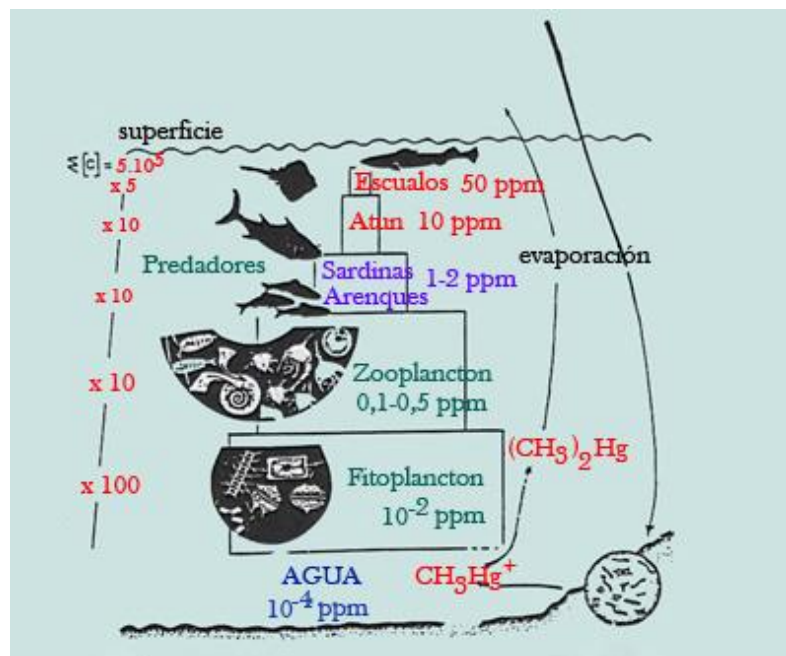


Figura 2: bioacumulación del mercurio en la cadena trófica marina. [15]

Este metal está presente en mayor cantidad en los pescados azules, siendo relevante comentar que los beneficios que aporta el consumo de pescado son mayores que los riesgos que genera el mercurio. Desde la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) recomiendan seguir las recomendaciones de la pirámide alimentaria en el consumo de pescado.

Los pescados que presentan mayor acumulación de este metal son el atún rojo grande, lucio, pez espada o emperador, el tiburón, la panga y la perca [15].

Dentro de los problemas ambientales más grandes de envenenamiento por mercurio ha sido el caso de la bahía de Minamata en el mar yatsushiro de Japón, este terrible daño ambiental fue ocasionado por la empresa Chisso ya que esta sintetizaba acetaldehído a partir de acetileno utilizando el toxico metal pesado mercurio II como catalizador partes del mercurio eran metalizados antes de ser incorporados o vertidos en el mar [15].

Hasta cierto punto, todas las formas del mercurio pueden llegar a acumularse, pero el metil mercurio se absorbe y acumula más que otras formas, siendo este el más tóxico para los microorganismos, un efecto común en el fitoplancton es la inhibición del crecimiento, normalmente relacionada con la reducción de la fotosíntesis. La presencia de sedimentos o materiales húmicos reduce la disponibilidad del mercurio para las plantas acuáticas vía absorción, de los compuestos de mercurio, el más perjudicial para las plantas son los organometalicos ya que reduce su crecimiento. [5]

El mercurio inorgánico también puede ser absorbido pero por lo general en menores cantidades y con menor eficiencia que el metil mercurio [14]. La biomagnificación del mercurio es el componente que más incide a la salud de animales y seres humanos; los peces adhieren con fuerza el metil mercurio debido a su afinidad por los compuestos proteínicos; casi el 100% del mercurio se bioacumula en peces depredadores como consecuencia de su dieta como se observa en la figura 3. Aunque en el contenido intestinal y en la mucosa de algunos peces el mercurio ha sido encontrado en su forma metilada debido a la ingesta o absorción del contaminante que está presente en el agua [16].

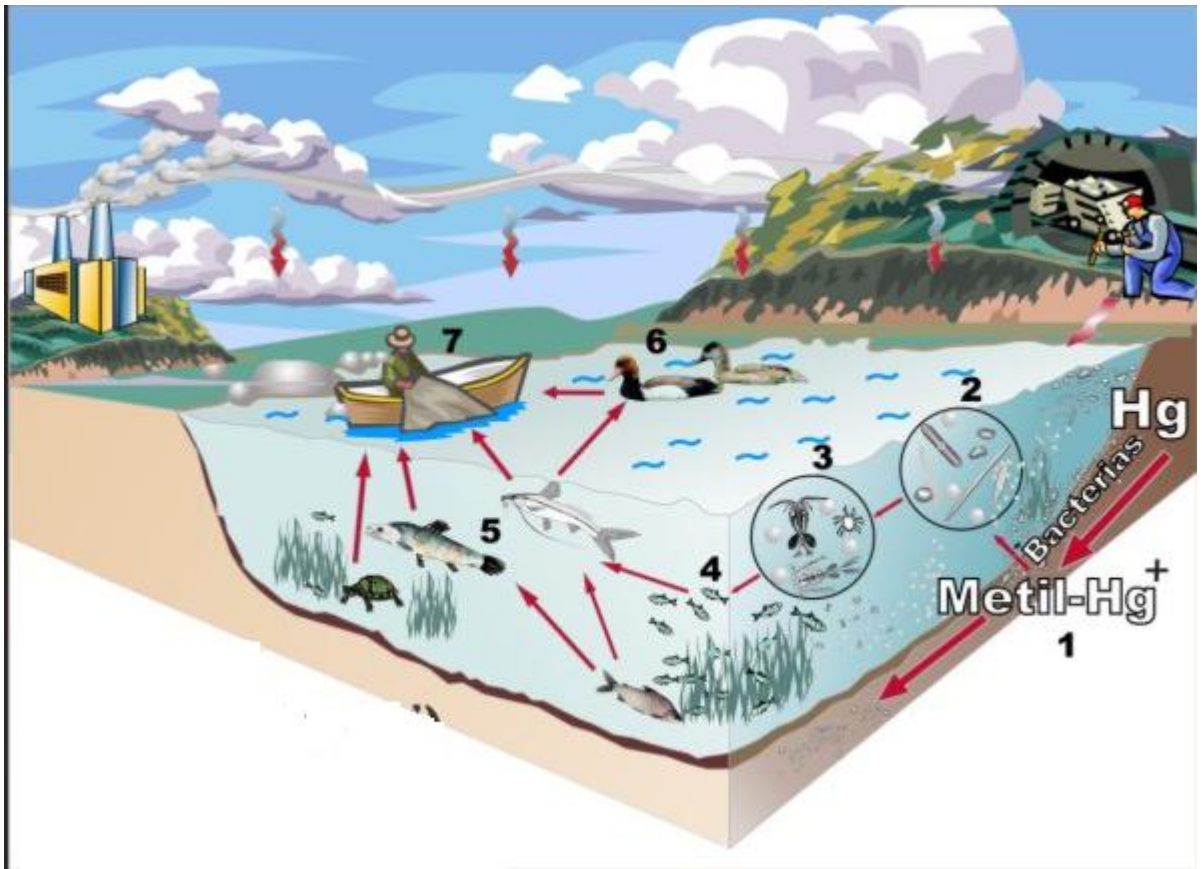


Figura 3: ciclo biogeoquímico del mercurio. [17]

En el mundo se han duplicado e incluso cuadruplicado los niveles de mercurio durante los últimos 25 años en focas anilladas y belugas de algunas áreas del Ártico canadiense y Groenlandia. En aguas más cálidas los mamíferos marinos depredadores también pueden estar en riesgo. Las aves piscívoras se exponen al mercurio por el pescado que consumen, en las regiones donde los peces tienen altas concentraciones de mercurio, estas aves pueden correr el riesgo de sufrir efectos en la reproducción y el comportamiento [14].

## 7. MARCO TEÓRICO

Los procesos que definen el transporte y destino del mercurio en la atmosfera son básicamente las emisiones, las transformaciones, transporte en la atmosfera y la deposición [5].

Las emisiones pueden tener como origen procesos naturales o bien sea antrópicos, entre los primeros, se encuentra la volatilización del mercurio desde medios acuáticos o marítimos, la volatilización a partir de la vegetación, la liberación de gases de materiales geológicos y las emisiones volcánicas. Es importante remarcar que las emisiones naturales de mercurio tienen lugar principalmente en forma de mercurio elemental. En cuanto a las emisiones antropogénicas, están inferidas a los procesos industriales y fuentes de combustión de contenido variable en mercurio, pudiendo darse en forma gaseosa como en forma particular [5].

Una vez que se encuentre el mercurio en el suelo este elemento estará sujeto a diferentes reacciones químicas y biológicas. Las condiciones del suelo como su pH, temperatura, acido húmico son generalmente favorables para formar compuestos inorgánicos de Hg (II) libres o unidos con aniones orgánicos. Sin embargo algunos compuestos de Hg (II) son bastante solubles, suelen formar complejos con la materia orgánica y arcillas de los suelos. Este comportamiento limita en gran medida la movilidad del mercurio en los suelos, haciendo que estos actúen como grandes reservas de mercurio antropogénico [5].

Existen diferentes formas por las cuales el mercurio puede entrar al dominio de las aguas terrestres. El Hg (II) y el metilmercurio pueden ser depositados directamente desde la atmosfera por vía seca o húmeda sobre los cuerpos terrestres; además pueden ser adicionados por acción de la lluvia; por otro lado, este lavado y arrastre de mercurio desde el suelo a las aguas terrestres puede realizarse a partir de corrientes de agua subterránea [5].

Las aguas costeras están potencialmente afectadas en mayor grado por especies reactivas de Hg y mercurio elemental liberados a la atmosfera por fuentes antropogénicas cercanas. Para algunos estuarios contaminados con Hg, la principal fuente de este contaminante puede llegar a ser la descarga acuática y no la deposición atmosférica.

En el caso de las aguas oceánicas, el aporte de Hg es mucho menor que el comentado por las aguas costeras. Para estas aguas se llega a una contaminación por deposición otorgada directamente por la atmosfera, el cambio de la especie en forma inorgánica (Hg) a las formas metiladas ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  y  $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ ) es el primer paso importante en los procesos de bioacumulación. La metilación es realizada principalmente en los sedimentos de las aguas oceánicas y cuerpos de aguas continentales [8].

Los mecanismos de síntesis de los compuestos metilados de mercurio tales como  $\text{CH}_3\text{HgCl}$  y  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ , han sido claramente identificados y en general pueden seguir dos rutas bioquímicas: una anaeróbica y la otra aeróbica. La primera involucra bacterias anaeróbicas, las cuales metilan mercurio inorgánico ( $\text{Hg}$ ) usando la metilcobalamina  $\text{CH}_3\text{CoB}$  (un compuesto análogo a la Vitamina B o cianocobalamina), sintetizada por bacterias metanogénicas. La metilcobalamina puede también ser generada por muchas bacterias reductoras de sulfato. Entre los organismos anaerobios que metilan el mercurio pueden destacarse el *Clostridium cochlearium* y *Desulfovibrio desulfuricans*. A pesar de que la producción de metilcobalamina depende de un catalizador enzimático, la biosíntesis de metilmercurio a partir de la reacción de  $\text{Hg}$  con metilcobalamina transcurre en forma no enzimática [8].

El metilmercurio ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) es ampliamente conocido como una sustancia neurotóxica. Ha sido listada por la International Program of Chemical Safety (IPCS) como una de las seis sustancias químicas más nocivas para el medio ambiente. La exposición a metilmercurio en humanos proviene casi exclusivamente del consumo de pescado y productos derivados de estos. Recientemente, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) ha definido la Dosis de Referencia, la cual corresponde a la concentración de mercurio que puede ser consumida diariamente a lo largo de la vida sin que se presente ningún efecto adverso. De acuerdo con la EPA este valor es  $0.1 \mu\text{g Hg/Kg}$  de peso corporal/día. La intoxicación ocasionada por la ingestión de pescado con altas concentraciones de metilmercurio es caracterizada por lesiones en el sistema nervioso central y periférico. Algunas de las manifestaciones neurológicas más frecuentes son las siguientes: inhabilidad para coordinar voluntariamente los movimientos de los músculos (ataxia), temblores anormales repetitivos en el cuerpo (tremor), percepción de sensaciones anormales de la piel tales como adormecimiento, punzaciones y quemaduras (parestesia), pérdida en el control del habla, disminución en la capacidad visual y auditiva, y parálisis cerebral, entre otros efectos [16].

La contaminación con mercurio en las zonas tropicales, particularmente en Brasil, Colombia, Ecuador y Bolivia es originada en los procesos de beneficio del oro, el cual es extraído mezclando la roca triturada enriquecida con el metal precioso con mercurio metálico para formar una amalgama, la cual es presionada con la mano para remover el exceso de mercurio. Este proceso ocasiona el derramamiento directo de grandes cantidades del metal en los ríos y en cuerpos de agua como ciénagas y lagunas. La amalgama mercurio-oro obtenida es quemada usualmente acampo abierto dejando libre el oro y liberando el tóxico metálico en forma de vapor directamente a la atmósfera. La mayoría de estos procesos son realizados muy cerca de las viviendas de los mineros, de tal forma que las familias respiran gran parte del vapor de mercurio volatilizado [18].

Diversas industrias dedicadas a la producción de componentes electrónicos, de química fina o las farmacéuticas producen grandes cantidades de efluentes cargados con metales pesados, existen diferentes tipos de procesos pero estos están directamente relacionados a la cantidad, al tipo de efluente o a la carga de la misma; la preocupación del ser humano es fundamentalmente por su líquido vital el agua y su salud, ya que en su mayoría los problemas y contaminaciones son atribuidas en gran parte a los procesos industriales; para mantener una calidad de vida, se ha preocupado por remover esos contaminantes o extraños en el agua con diferentes procesos como la adsorción sobre carbón activo, electrólisis, intercambio iónico, filtración a través de membranas, precipitaciones en forma de hidróxidos, sulfuros o extracción con disolventes presentan ventajas e inconvenientes (Tabla 1) [19].

| Tecnología Aplicada           | Características Generales      |                            |                                         |                                   |                                           |
|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------|
|                               | Tolerancia a los cambios de pH | Selectividad a los metales | Influencia de los Sólidos en suspensión | Tolerancia a sustancias orgánicas | Niveles de metal óptimos soportables mg/L |
| Adsorción sobre carbon activo | Baja                           | Moderada                   | Muy alta                                | Pueden inactivar el carbon        | <10                                       |
| Electrólisis                  | Alta                           | Moderada                   | Baja                                    | Alta                              | >10                                       |
| Intercambio Iónico            | Baja                           | Alta                       | Muy alta                                | Inactivan la resina               | <100                                      |
| Filtración por membrana       | Baja                           | Moderada                   | Muy alta                                | Intolerancia                      | >10                                       |
| Precipitación de hidróxidos   | Alta                           | Baja                       | Baja                                    | Alta                              | >10                                       |
| Precipitación por sulfuros    | Baja                           | Depende del pH             | Baja                                    | Alta                              | >10                                       |
| Extracción orgánica           | Media                          | Alta                       | Muy alta                                | Intolerancia                      | >100                                      |

Tabla 1: Características generales de las tecnologías para la eliminación de metales pesados. [19].

Por lo que hoy en día se está tratando de investigar, estudiar y utilizar diferentes tipos de microorganismos que sean capaces de remover, absorber o eliminar ciertos contaminantes de las aguas residuales (Tabla 2, Tabla 3).

Los hongos tienen muchas ventajas que facilitan el estudio en procesos de biorremediación, pues están presentes en sedimentos acuáticos y en hábitats terrestres y sus hifas pueden penetrar el suelo contaminado además de producir enzimas extracelulares que degradan los contaminantes [20].

| Tipo de biomasa y | Metal | pH | T(°C) | Compuesto Químico Añadido |
|-------------------|-------|----|-------|---------------------------|
|-------------------|-------|----|-------|---------------------------|

| de soporte                                                            |                       |         |    |                                                |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------|---------|----|------------------------------------------------|
| Inmovilizado en alumina cerámica                                      | Cr(VI)                | 2-12    | 25 | No aplica                                      |
| <i>Aspergillus terreus</i> fijado en una matriz de poliuretano        | Ni(II),Cr(VI),Fe(III) | 1       | 25 | Glucosa                                        |
| <i>Arthrobacter Viscosus</i> inmovilizada en carbon activado granular | Cr(VI),Cd(II)         | 6       | 25 | No aplica                                      |
| <i>Escherichia coli</i> inmovilizada en carbon activado               | Cr(VI),Cd(II), Pb(II) | 6.6-7.5 | 25 | NaCl,MgCl,NaNO <sub>3</sub> ,CaCl <sub>2</sub> |

Tabla 2: microorganismos capaces de remover metales pesados con adición de compuestos químicos. [21]

Los métodos convencionales para el tratamiento de aguas residuales con metales que incluyen: precipitación, oxidación, reducción, intercambio iónico, filtración, tratamiento electroquímico, resultan costosos y en algunos casos ineficientes, especialmente cuando la concentración de los metales es muy baja. El uso de sistemas biológicos para la eliminación de metales pesados a partir de soluciones diluidas tiene el potencial para hacerlo mejor y a menor costo.

Los métodos químicos resultan costosos debidos a que el agente activo no puede ser recuperado para su posterior reutilización. Además el producto final son lodos con altas concentraciones de metales, los microorganismos y sus productos pueden ser bioacumuladores muy eficientes de metales solubles y particulados, por esto las tecnologías basadas en los microorganismos ofrecen una alternativa o ayudan a las técnicas convencionales para la eliminación/recuperación de metales [22].

| Biosorbente                 | Biopolímero involucrado | Metal                                                |
|-----------------------------|-------------------------|------------------------------------------------------|
| <i>Sargassum sp. (alga)</i> | Polialginatos           | Ni <sup>+2</sup> ,Cd <sup>+2</sup> ,Cu <sup>+2</sup> |

|                                                |                          |                                                                                                                                                                          |
|------------------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>Spirulina sp.</i>                           | Polialginatos, fucanos   | $\text{Cu}^{+2}$ , $\text{Cd}^{+2}$ , $\text{Ni}^{+2}$ , $\text{Cd}^{+2}$                                                                                                |
| <i>Saccharomyces c. (levadura)</i>             | péptidoglucanos          | $\text{Pb}^{+2}$ , $\text{Ni}^{+2}$ , $\text{Cr}^{+6}$ , $\text{Au}^{+3}$ , $\text{Cd}^{+2}$ , $\text{Ni}^{+2}$ , $\text{Cr}^{+3}$ , $\text{Cd}^{+2}$ , $\text{Cu}^{+2}$ |
| <i>Lentinus edodes (hongo)</i>                 | Polisacáridos, lentinano | $\text{Cd}^{+2}$                                                                                                                                                         |
| <i>Ascophyllum nodosum (alga)</i>              | Polialginatos            | $\text{Cd}^{+2}$                                                                                                                                                         |
| <i>Enterobacter cloaceae (bacteria marina)</i> | Exopolisacárido          | $\text{Cd}^{+2}$ , $\text{Co}^{+2}$ , $\text{Hg}^{+2}$ , $\text{Cu}^{+2}$                                                                                                |
| <i>Manihot sculenta (planta superior)</i>      | Celulosa                 | $\text{Zn}^{+2}$ , $\text{Cd}^{+2}$                                                                                                                                      |
| <i>Sphaerotilus natans (bacteria)</i>          | Celulosa, glucanos       | $\text{Pb}^{+2}$ , $\text{Cu}^{+2}$ , $\text{Zn}^{+2}$ , $\text{Cd}^{+2}$                                                                                                |
| <i>Fontinalis antipirética (musgo)</i>         | Fitoquelatinas           | $\text{Zn}^{+2}$ , $\text{Cd}^{+2}$                                                                                                                                      |
| <i>Funalia trogii (hongo inmovilizado)</i>     | Alginato-quitosano       | $\text{Zn}^{+2}$ , $\text{Hg}^{+2}$ , $\text{Cd}^{+2}$                                                                                                                   |
| <i>Mucor rouxii (hongo)</i>                    | Quitosano, polisacáridos | $\text{Zn}^{+2}$ , $\text{Hg}^{+2}$ , $\text{Cd}^{+2}$ , $\text{Pb}^{+2}$ , $\text{Zn}^{+2}$ , $\text{Cd}^{+2}$ , $\text{Ni}^{+2}$                                       |
| <i>Oryza sativa (planta superior)</i>          | Ligninas, celulosa       | $\text{Zn}^{+2}$ , $\text{Cd}^{+2}$ , $\text{Pb}^{+2}$ , $\text{Al}^{+3}$ , $\text{Cu}^{+2}$                                                                             |

Tabla 3: microorganismos capaces de remover contaminantes utilizando biopolímeros [23].

Se ha descrito que los hongos y levaduras también pueden captar metales pesados. Debido a esta capacidad estos microorganismos pueden ser utilizados para tratamientos alternativos de estos contaminantes bien sea del agua o del suelo (Tabla 3) [24].

En particular, se ha mencionado que la captura de metales por la biomasa de hongos parece ser un proceso que involucra la acumulación y/o la bioadsorción. Por ejemplo, la superficie celular de las levaduras puede actuar como una resina de intercambio iónico, mientras que las paredes celulares de los hongos tienen un

rol principal en la bioadsorcion. Saglam et al. Estudiaron la capacidad de bioadsorcion de 250 mg/L cloruro de mercurio (Hg (II)), MeHg y etilmercurio de soluciones acuosas, sobre la biomasa de *Phanerochaete chrysosporium*. Los resultados obtenidos demostraron que la máxima capacidad de bioadsorcion varió entre 79 y 61 mg/g peso seco, para los diferentes compuestos. Estos valores fueron superiores a los reportados para otros microorganismos (3-58 mg Hg/g peso seco) [24].

## 8. DESARROLLO CENTRAL

### 8.1 METODOLOGÍA

Para la elaboración de la investigación se siguieron los diferentes pasos secuenciales, que conllevaron a término el proyecto.

#### 8.1.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Las muestras de las cuales se aislaron los microorganismos aptos para la inmovilización de metales fueron recolectadas en diferentes tramos del Río Bogotá, por lo tanto el área de estudio comprende la cuenca alta del Río Bogotá, específicamente los municipios de VillaPinzón y Chocontá, ubicados en el departamento de Cundinamarca. Estas muestras fueron suministradas por la profesora Ángela María Jaramillo Londoño del *Grupo el grupo investigación de Sostenibilidad Ambiental de la Facultad de Ciencias Ambientales de la Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales (UDCA)*. Específicamente fueron provistas por el grupo que trabaja en el proyecto titulado “Transformación ambiental a lo largo del curso alto del río Bogotá”.

#### 8.1.2 MUESTREO Y ZONA DE INFLUENCIA.

Las muestras que se obtuvieron de esta zona fueron las correspondientes a los sedimentos presentes en el fondo del río Bogotá y en las laderas del río, alrededores, obteniendo así un lodo con diferentes características físico-químicas que permitieron tener una gran variedad de microorganismos que se asumiría que estaría presente a lo largo y ancho del río Bogotá.

Como se puede apreciar en la figura 4 la línea azul es la que nos muestra el cauce del río Bogotá desde el municipio de Villa Pinzón hasta la ciudad de Bogotá D.C.

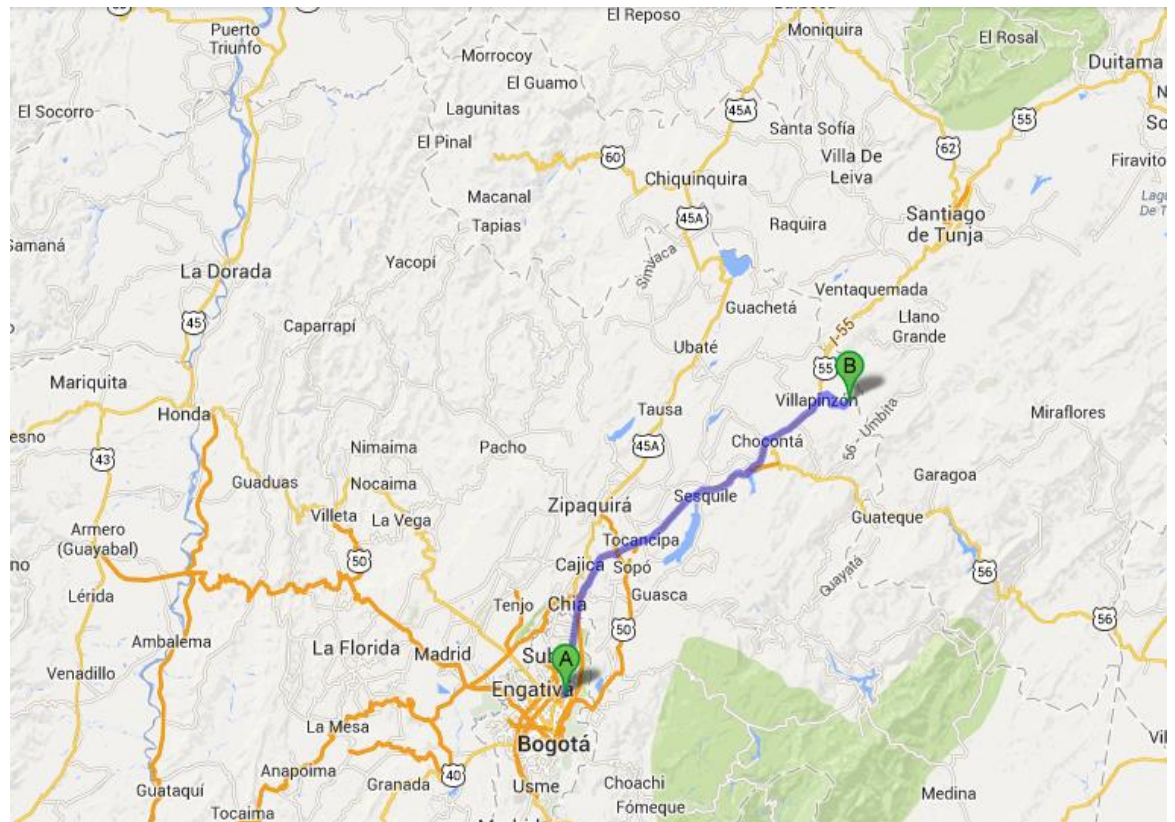


Figura 4: zona de influencia rio Bogotá. [25]

## 8.2 SELECCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS.

### 8.2.1 EVALUACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO.

Los diferentes hongos que fueron objeto de estudio necesitan macronutrientes y micronutrientes, por esto se evaluarán las siguientes variables presentes en los diferentes medios de cultivo disponibles en el mercado:

- Carbono.
- Calcio.
- Nitrógeno.
- Aminoácidos.
- Fósforo.
- Yodo.
- Potasio.
- Sodio.
- Azúcares.
- Disponibilidad en laboratorio.
- Precio.

Se realizará una tabla comparativa entre los medios de cultivo aptos para el crecimiento de los hongos, donde se comparen la información nutricional de cada una de las variables.

### 8.2.2 PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO.

Para el aislamiento primario de los hongos, se pueden utilizar diferentes tipos de medios de cultivo, como por ejemplo: selectivos, por composición, definidos, complejos, por utilización o diferenciales. Estos medios hay que seleccionarlos en función del hongo que se sospeche y del tipo de muestra.

Los medios de cultivo se utilizaron en tubos cerrados con tapón de rosca o en cajas de Petri. La gran superficie de estas últimas facilita el aislamiento y la disolución de sustancias inhibitorias en las muestras. Es importante que el medio de cultivo no se seque por lo que el espesor de las mismas debe ser por lo menos de 25 mm (milímetros) que equivale a 15-25 ml (mililitros) de medio.

La temperatura de incubación debe ser seleccionada teniendo en cuenta el tipo de hongo, en general, los medios de cultivo se deben incubar a temperatura ambiente, durante una semana.

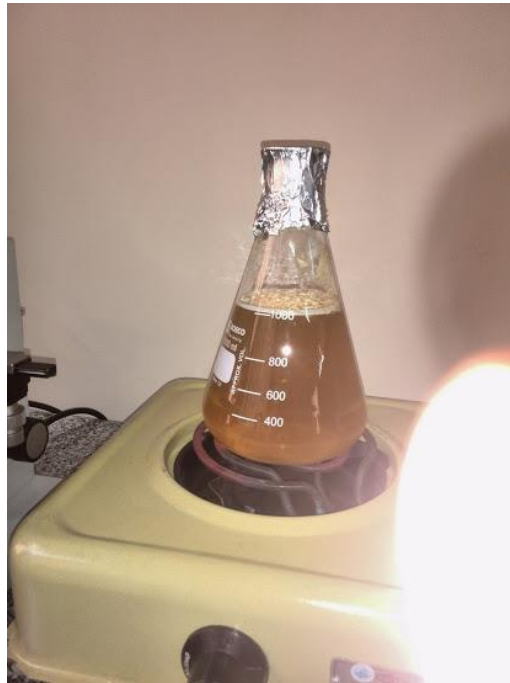


Foto 1: medio solido



Foto 2: medio líquido.

### 8.2.3 SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS.

Para la selección de los microorganismos que serían objeto de estudio se realizó lo siguiente.

- En diferentes cajas de Petri con medio de cultivo, se introdujeron 3g de sedimento provenientes del río Bogotá.
- Las cajas de Petri fueron dejadas a temperatura ambiente durante una semana, en el laboratorio de microbiología de la Universidad Santo Tomás.
- Se aislaron las 10 diferentes cepas, en cajas de Petri para que posteriormente pudieran ser estudiadas las cepas de manera individual y sin contaminación por otros microorganismos.
- Se preparó el medio de cultivo TSB con una adición de  $3\mu\text{gHg/L}$ , para probar la tolerancia del hongo, ya que no se contaba con un medio líquido para hongos en el laboratorio.

### 8.2.4 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS COLONIAS.

A partir del aumento del tamaño de las colonias, de las cepas aisladas en las placas de cultivo en condiciones ambientales se evaluaron sus características macroscópicas registrando lo siguiente:

- Tamaño de la colonia (mm).
- Color (blanco, naranja, transparente, etc.).
- Forma (circular, ovalada, etc.).
- Elevación (elevada, cóncavo, convexo).
- Superficie (rugosa).
- Luz reflejada (translúcidas, opacas).

### 8.2.5 PRUEBAS DE TOLERANCIA.

Después de obtener las diferentes cepas tolerantes (6 cepas) se realizaron dos réplicas de los hongos en cajas de Petri para posteriormente realizar las pruebas de tolerancia a diferentes concentraciones de mercurio, de estas réplicas se obtuvieron 12 cajas de Petri. El mercurio se agregó a los medios de cultivo mediante una probeta calibrada, los cálculos para obtener las concentraciones se encuentran a continuación.



Foto 3: cajas de Petri.



Foto 4: prueba de tolerancia.

La prueba de tolerancia consistió en realizar una serie de disoluciones ( $\mu\text{Hg/L}$ ). Para este proyecto se usaron las siguientes concentraciones: Alta que será dos (2) veces más que la concentración que se encuentre en el ambiente ( $6 \mu\text{Hg/L}$ ), la concentración del ecosistema ( $3 \mu\text{Hg/L}$ ) [26] y una concentración híper que será tres (3) veces más alta que la concentración del ecosistema ( $9 \mu\text{Hg/L}$ ). [27], Las disoluciones se realizaron en diferentes tubos de ensayo, en los tubos de ensayo se encontraban varias especies hongos y medios de cultivo ricos en nutrientes.



Foto 5: réplicas en medio líquido.

Para poder realizar las disoluciones en los medios de cultivo se utilizó un balón con una concentración de ( $12\mu\text{Hg/L}$ ) doce microgramos por litro, para obtener las concentraciones se realizaron los siguientes cálculos:

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

$$1200 \mu\text{g/l} * V_1 = 3 \mu\text{g/l} * 7\text{ml}$$

- Para concentración de  $3\mu\text{g/l}$

$$v_1 = \frac{3 \frac{\mu\text{g}}{\text{l}} * 7\text{ml}}{1200 \frac{\mu\text{g}}{\text{l}}}$$

$$v_1 = 0.0175\text{ml}$$

- Para concentración de  $6\mu\text{g/l}$

$$v_1 = \frac{6 \frac{\mu\text{g}}{\text{l}} * 7\text{ml}}{1200 \frac{\mu\text{g}}{\text{l}}}$$

$$v_1 = 0.035ml$$

- Para concentración de  $9\mu g/l$

$$v_1 = \frac{9 \frac{\mu g}{l} * 7ml}{1200 \frac{\mu g}{l}}$$

$$v_1 = 0.0525ml$$

## 9. RESULTADOS OBTENIDOS.

De todos estos medios de cultivo para hongos se utilizó para el desarrollo de este proyecto el medio de cultivo potato dextrose agar ya que cuenta con los nutrientes suficientes para promover el crecimiento de diferentes hongos (mohos).

| Selección del medio de cultivo |                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|--------------------------------|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Nombre comercial               | Ingredientes            | Descripción                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| PAPA DEXTROSA AGAR (PDA)       | Papa 200g               | Es un medio muy usado que sirve para aislar todo tipo de hongos. Beauveria, Paecilomyces, Lecanicillium (Verticillium) y Metarhizium, los importantes hongos parásitos de insectos, al igual que los parásitos de plantas y los hongos saprofitos crecen muy bien y esporulan en este medio.                                                                        |
|                                | Dextrosa 10g            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|                                | Agar 18g                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|                                | Agua destilada 1L       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| FITOLEVADURA                   | Dextrosa 20g            | Este medio se usa para aislar hongos a partir de animales. Los hongos aislados de insectos crecen exuberantemente con micelio bien algodonoso y buena producción de esporas.                                                                                                                                                                                        |
|                                | Extracto de levadura 5g |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|                                | Peptona 5g              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|                                | Agar 18g                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| SABOURAUD                      | Agua destilada 1L       | Es un medio de cultivo muy utilizado para aislar hongos de animales. Sirve para el aislamiento y mantenimiento de hongos en tubo inclinado. Debido a su composición, los hongos crecen exuberantemente y esporulan bien. Es el estándar para observar la morfología típica de los hongos, pero no es el medio ideal de crecimiento o para estudiar la esporulación. |
|                                | Dextrosa 20g            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|                                | Peptona 10g             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|                                | Agar 18g                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| MIEL PEPTONA AGAR              | Agua destilada 1L       | Este medio se recomienda porque tiene un pH que inhibe el desarrollo de algunas bacterias                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|                                | Miel de caña 60g        |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|                                | Peptona 10g             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|                                | Agar 18g                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

Tabla 4: Medios de cultivo para hongos [28]

- En la tabla 5 se puede apreciar la evaluación para determinar qué medio de cultivo era el más adecuado para los hongos que serían objeto de estudio.

| Selección de medio de cultivo |         |        |           |             |         |      |         |       |        |                               |        |  |
|-------------------------------|---------|--------|-----------|-------------|---------|------|---------|-------|--------|-------------------------------|--------|--|
| Nombre comercial              | Carbono | Calcio | Nitrógeno | Aminoácidos | Fosforo | Yodo | Potasio | Sodio | Azúcar | Disponibilidad en Laboratorio | Precio |  |
| PAPA DEXTROSA AGAR (PDA)      | +       | +      | ++        | ++          | +       | +    | +       | +     | +      | ++                            | ++++   |  |
| FITOLEVADURA                  | ++      | ++     | +         | +           | +       | +    | ++      | +     | ++     | ++                            | +      |  |
| SABOURAUD                     | ++      | +      | ++        | +           | +       | +    |         |       | ++     | +                             | ++     |  |
| MIEL PEPTONA AGAR             | +       | +      | ++        | ++          | +       | +    |         |       | +++    |                               | +++    |  |

Tabla 5: Evaluación nutricional de los medios de cultivo para hongos.

- Al cabo de la primera semana de incubación se encontraron 10 diferentes cepas de hongos.
- Cuatro de los diez hongos que inicialmente se obtuvieron, no resistieron la carga contaminante de 3 µg Hg/l así que se obtuvo como resultado 6 cepas tolerantes al mercurio, que siendo afectados por el agente tóxico en su ambiente tuvieron un crecimiento más lento llegaron a su desarrollo y se aislaron en PDA formando colonias en 2 semanas a temperatura ambiente en el laboratorio.
- En la tabla 6 se puede apreciar la caracterización morfológica donde apreciamos los siguientes parámetros: tamaño, color, forma, elevación, superficie y luz reflejada.

| Caracterización morfológica                                                         |         |        |             |             |           |            |               |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------|--------|-------------|-------------|-----------|------------|---------------|
| Foto                                                                                | Nombre  | Tamaño | Color       | Forma       | Elevación | Superficie | Luz reflejada |
|    | Hongo 1 | 8 cm   | Naranja     | Ovalada     | Elevada   | Rugosa     | Opaca         |
|    | Hongo 2 | 4 cm   | Blanco      | Rectangular | Elevada   | Rugosa     | Opaca         |
|    | Hongo 3 | 5 cm   | Gris claro  | Lineal      | Elevada   | Rugosa     | Traslucida    |
|   | Hongo 4 | 10 cm  | Gris oscuro | Ovalada     | Convexo   | Rugosa     | Opaca         |
|  | Hongo 5 | 9 cm   | Azul Oscuro | Circular    | Plano     | Rugosa     | Opaca         |
|  | Hongo 6 | 9.5 cm | Azul gris   | Circular    | Plano     | Rugosa     | Opaca         |

Tabla 6: Caracterización morfológica.

- Se mandaron a analizar los resultados al aplicar hongos que resistieron la prueba de adición de 3  $\mu\text{g}$  Hg/l en el medio, fueron analizados por el laboratorio Analquim en la ciudad de Bogotá D.C., las muestras enviadas tenían una carga contaminante de 9  $\mu\text{g}$  Hg/l y tenían un periodo de incubación de una semana a condiciones de ambiente el método de análisis fue espectrofotometría (absorción atómica).
- Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7 donde las tasas de remoción o absorción se encuentran entre el 55.5% y el 66.6%
- Los hongos que demostraron mayor absorción o remoción fueron el hongo 2 y el hongo 5.

| Remoción y/o acumulación de mercurio                                                |         |                                                 |                                               |                                       |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------|
| Foto                                                                                | Nombre  | Concentracion Inicial<br>( $\mu\text{g Hg/L}$ ) | Concentracion Final<br>( $\mu\text{g Hg/L}$ ) | Factor de remoción<br>y/o acumulación |
|    | Hongo 1 | 9                                               | 4                                             | 55.5%                                 |
|    | Hongo 2 | 9                                               | 3                                             | 66.6%                                 |
|   | Hongo 3 | 9                                               | 4                                             | 55.5%                                 |
|  | Hongo 4 | 9                                               | 4                                             | 55.5%                                 |
|  | Hongo 5 | 9                                               | 3                                             | 66.6%                                 |
|  | Hongo 6 | 9                                               | 4                                             | 55.5%                                 |

Tabla 7: Resultados de remoción o acumulación por hongos.

## 10. DISCUSIÓN Y APLICACIÓN.

En este trabajo el objetivo principal fue evaluar la capacidad de tolerancia y remoción del mercurio mediante hongos. Para poder llegar a cumplir este objetivo fue necesario realizar diferentes ensayos y estudios preliminares en laboratorio, y así determinar cuál sería la capacidad de tolerancia de los microorganismos antes de probar su capacidad para remover o absorber el metal, ya que esta depende de la capacidad, eficiencia y selectividad, además de su equivalencia con los tratamientos fisicoquímicos actualmente en uso y su economía, ya que al poder utilizar microorganismos como los hongos se necesitarán únicamente los diferentes reactores o infraestructuras donde ellos deberán estar para actuar como medio filtrante, obteniendo así un costo de operación y de mantenimiento menor, en cambio en los tratamientos fisicoquímicos se necesitarán agentes químicos para separar o capturar los metales pesados, además que los costos de mantenimiento serán más altos debido a la necesidad de agentes abrasivos. [29]

Sin duda, ciertos tipos de biomasa o productos derivados de esta pueden lograr unas altas eficiencias a la hora de remover metales o recuperarlos para su posterior uso en la industria, esto no quiere decir que podrían llegar a sustituir los tratamientos convencionales ya que no se está llegando a analizar el efecto costo beneficio de estas tecnologías pero sí se podría llegar a pensar en utilizarlos como tratamientos adicionales a los tratamientos convencionales. [29]

Cabe destacar que aunque no se obtuvieron remociones del orden el 70% al 90% como se pueden obtener en tratamientos fisicoquímicos [30] [31] , como se observa en el la tabla 8, se puede llegar a pensar que los microorganismos presentes en diferentes ecosistemas pueden llegar a ser una solución al problema de la contaminación en cuerpos de agua o aportar un papel importante en la digestión, acumulación o absorción de los contaminantes, ya que los hongos que fueron objeto de estudio y están en listados en la tabla 7 fueron aislados del sedimento tomado de la cuenca alta del rio Bogotá, que corresponde a un ambiente con presencia de metales pesados, especialmente por mercurio, llegaron a obtener una remoción y/o acumulación del 55% al 66% del mercurio (Hg) presente en

las muestras analizadas, lo cual es muy favorable para las investigaciones posteriores ya que se puede llegar a optimizar esta remoción y/o acumulación modificando diferentes parámetros físico-químicos, como lo es el pH, la selectividad y los Biosorbentes. [29]

Al observar los resultados de laboratorio que cada una de las cepas de hongos obtuvieron, se puede afirmar que así no se conozcan las rutas metabólicas, la química o la genética de estos hongos, se está desaprovechando la capacidad microbiana en sí para el tratamiento de los cuerpos de agua, o porque no el de la biosfera, por tal motivo este proyecto de investigación pretende explorar las capacidades que tienen estos hongos para generar soluciones a los diferentes problemas de contaminación ambiental.

La disminución de mercurio disuelto en el medio acuoso puede deberse a varios factores, como la endotérmica, la energía dependiente de la eliminación de metales por los microorganismos se ve influenciada en gran medida por la temperatura ya que el proceso de adsorción es fisicoquímico. [32] Además la superficie celular de las levaduras puede actuar como una resina de intercambio iónico, mientras que las paredes celulares de los hongos tienen un rol principal en la bioadsorción, un posible rol en el mecanismo de tolerancia podría deberse a aquellos codificantes para hidrofobinas (proteínas presentes en hongos filamentosos), las que podrían estar implicadas en la captura de Hg en la pared celular [24], o a través precipitación extracelular, formación de complejos y cristalización, transformación de especies de metales (por ejemplo oxidación, reducción, metilación y desalquilación), biosorción a paredes celulares, pigmentos y polisacáridos extracelulares, transporte disminuidos o impermeabilidad, expulsión, compartimentalización, intracelular y precipitación y/o atrapamiento por ciertas moléculas. [33] Esta transformación biológica del mercurio que resulta tóxico mediada por enzimas microbianas puede dar como resultado compuestos poco solubles en agua o bien compuestos volátiles; aunque determinar: que mecanismo es el que ocurre está fuera de los alcances de este estudio [34]

Por otra parte se siguen utilizando alrededor del globo los tratamientos fisicoquímicos, aun cuando se sabe que se deben generar grandes costos asociados a diferentes variables que deberán estar controladas para obtener remociones del 93% al 97% tales como: Temperatura, pH, coagulantes y/o superficie de absorción [35].

Por otro lado las tecnologías microbianas se mencionan reiteradamente en la web, bases de datos, aparentemente son muy costosas y sus aplicaciones son muy selectas debido a la poca investigación o la selectividad de los microorganismos, sin embargo estas tecnologías: especialmente las que utilizan hongos/levaduras para la remoción de metales pesados en aguas contaminadas son las más optadas para aplicaciones debido a su crecimiento de corto plazo, su fácil manipulación y sus demandas no tan exigentes a la hora de pH, oxígeno, espacio o nutrientes. [29]

### 10.1 Aplicación

En esta sección se proyecta la aplicación de la biorremediación con hongos para la descontaminación señalando los parámetros determinantes que deben ser considerados en próximos proyectos. En el diagrama 4 se puede apreciar el esquema de una planta piloto para la recuperación microbiana del mercurio aprovechando la tolerancia de los hongos al componente químico y su capacidad para absorber el metal.

Construido para tratamiento continuo; llenado con gránulos de piedra pómez como soporte sólido o cualquier otro tipo de soporte donde los hongos tolerantes puedan realizar su crecimiento y tener contacto directo con los vertimientos. Modo de operación es de flujo vertical ascendente; la inoculación fue hecha con siete cultivos de cepas de hongos resistentes al mercurio.

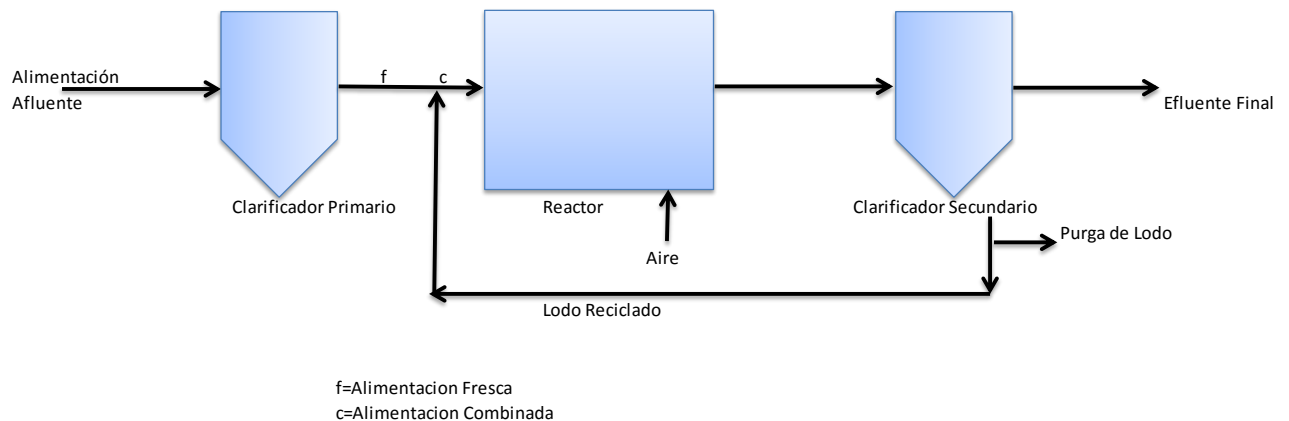


Figura 5: Biorremediación de Hg en la Planta Piloto de Agua Residual lodos activados. [36]

El término “lodo activado” se aplica al conglomerado de microorganismos, materia orgánica y materiales inorgánicos. Las superficies de estos flóculos son altamente

activas en la acción de absorber materiales coloidales suspendidos que se encuentran en el agua residual

Este proceso depende del uso de una alta concentración de microorganismos presentes como flóculo (población microbiana mixta) que se mantiene suspendido por medio de agitación en el reactor, obteniendo el licor mezclado altas tasas de transferencia de oxígeno

Para poder alcanzar las tasas de remoción que los hongos obtuvieron en la tabla 8 se deben tener en cuenta los siguientes parámetros:

#### TIEMPO DE RETENCIÓN HIDRÁULICO (TRH)

El TRH, es el tiempo que permanece el agua residual dentro del reactor y se utiliza para comparar reactores más que para diseño. Sin embargo es variable de diseño cuando existe una concentración baja de carga orgánica. A partir de los resultados del proyecto se estima que la remoción de carga contaminante durante 24 h fue de 0.0126 µg.

$$TRH = \frac{\text{Volumen del reactor}}{\text{Gasto } (L/h) + Q \text{ recirculacion } (L/h)}$$

#### TIEMPO DE RETENCIÓN CELULAR (TRC)

El tiempo de retención celular se define como el tiempo (días) que permanece la biomasa (microorganismos) dentro del sistema (reactor biológico), el TRC tiene mucha aplicación como variable de diseño y operación. Se requiere medir la residencia del microorganismo para continuar esta línea de investigación.

$$TRC = \frac{\text{Concentracion de biomasa SSTLM (ppm)} * \text{Volumen del reactor } m^3}{\{Q \text{ Purga (ppm)} * SST \text{ inoculo (ppm)}\} + \left\{Q_{inf} \left( \frac{m^3}{d} \right) * SST \text{ eflu(ppm)} \right\}}$$

#### RELACIÓN ALIMENTO/MICROORGANISMO (A/M)

Para una operación conveniente del sistema de lodos activados, es necesario que los microorganismos tengan la cantidad adecuada de alimento, el parámetro denominado relación alimento/microorganismo, A/M se define como:

$$\frac{A}{M} = \frac{Q \text{ in reactor} \left( \frac{m^3}{d} \right) * DBO_5 \text{ infl Planta (ppm)} * 24h}{Volumen reactor (m^3) * SSVLM(ppm)}$$

## FLUJO DE AIRE

El aire proporciona el oxígeno al licor mezclado dentro del reactor, necesario para la biooxidación de la materia orgánica, el requerimiento de oxígeno es expresado como la masa de oxígeno transferida por unidad de volumen por unidad de tiempo (kg O<sub>2</sub>/m<sup>3</sup> por unidad de tiempo). La disolución de oxígeno no es la sola función del sistema de aeración, ya que también suministra la agitación necesaria para mantener en suspensión los flóculos del lodo y el licor mezclado tan homogéneo como sea posible. Si la agitación es insuficiente, el contacto reducido entre microorganismos y nutrientes retardará la tasa de remoción de nutrientes.

## INDICE VOLUMÉTRICO DE LODOS (IVL)

El IVL se define como el volumen en mililitros ocupado por 1 g de sólidos en suspensión del licor mezclado, expresado en peso seco, después de sedimentar durante 30 minutos en una probeta graduada de 1000 ml.

$$IVL = \frac{\text{Volumen de solidos sedimentados en 30 min} \left( \frac{ml}{L} \right) * 1000}{\text{Solidos suspendidos de licor mezclado} \left( \frac{mg}{l} \right)}$$

Los parámetros antes mencionados influyen considerablemente en el crecimiento de los microorganismos filamentosos; también pueden servir como indicadores del comportamiento de la operación de la planta, ya que se presentarán efectos durante el proceso de tratamiento (lodo inflado en el clarificador); que se pueden prevenir controlando adecuadamente el TRC, TRH, A/M y el IVL.

Además para controlar y garantizar el crecimiento de los hongos que fueron objeto de estudio en el presente proyecto podemos aprovechar y/o adicionar lo siguiente:

- Los diferentes hongos requieren fuentes de nitrógeno y pueden utilizar nitrato o amonio.
- Los aminoácidos, la urea y proteínas son utilizados para el crecimiento.
- Se puede agregar caseína hidrolizada como fuente de nitrógeno.
- Se deberá garantizar un pH entre 4 y 6 para un óptimo funcionamiento del sistema, ya que el pH puede afectar la solubilidad de los metales y un pH bajo afecta los sistemas enzimáticos.

## 11. CONCLUSIONES.

- Se adquirieron 10 diferentes cepas de hongos o mohos provenientes a la cuenca alta del río Bogotá, ubicada entre los municipios de Villa Pinzón y Chocontá, además se ha reportado que diferentes cepas de hongos expuestos pueden ser utilizados en procesos de biotecnología como la biorremediación [37], aunque en el presente proyecto no se logró identificar las especies de los hongos debido a los altos costos y falta de recursos en el laboratorio de la universidad.
- La capacidad de trabajo en el laboratorio de la Universidad Santo Tomás era limitada debido a la cantidad de reactivos que se tenían en este, bien se sabe que no todos los microorganismos necesitan la misma cantidad de nutrientes, sin embargo, tras la evaluación nutricional de los medios de cultivos se decidió utilizar el medio de cultivo PDA potato dextrose agar ya que la base del medio es altamente nutritiva y permite la esporulación y la producción de pigmentos en algunos dermatofitos como se puede apreciar en la tabla 6.
- El efecto de la exposición previa al contaminante en su ambiente natural hizo que las 6 cepas seleccionadas de hongos o mohos pudieran soportar e incrementar sus colonias, adicionando 9 ug/L de mercurio el cual es tres veces mayor al del encontrado en el medioambiente, aunque su crecimiento y su punto de equilibrio tardaran en llegar, debido al estrés del contaminante.
- Existe evidencia de remoción del contaminante presente en el ambiente natural y en los ensayos de laboratorio, las 6 cepas que se inmovilizaron presentaron cierta capacidad para almacenar o procesar alguna especie de mercurio, esto puede estar asociado a las diferentes procesos tanto microbianos (adsorción en la membrana) o químicos (volatilización o precipitación del mercurio), sin embargo los ensayos de laboratorio arrojaron resultados de remoción, almacenamiento o transformación de mercurio en un 55% a un 66% lo cual hace a estos microorganismos capaces de ser una alternativa de tratamiento de aguas residuales a final del tubo, ya que estas remociones o transformaciones se alcanzaron en condiciones ambiente, lo cual si, se juega con diferentes variables como: nutrientes, pH, tasa de crecimiento, luz solar, los hongos podrían llegar a

tener una mayor eficiencia lo cual se deberá analizar en un proyecto de investigación a futuro.

## 12. RECOMENDACIONES

Una vez concluida la tesis, se considera interesante investigar sobre otros aspectos relacionados con el tratamiento microbiano y se propone:

- Profundizar los estudios expuestos en esta tesis para así determinar las variables para la construcción del reactor de flujo continuo.
- Trabajar en mejorar los insumos y recursos del laboratorio de microbiología de la Universidad Santo Tomas.
- Analizar con detenimiento que factores se podría mejorar para obtener remoción, acumulación o absorción del contaminante.

### 13. BIBLIOGRAFÍA.

- [1] C. X. Ramos, «Nivel de contaminacion por mercurio en la region de la mojana,» *Centro de investigaciones de en ingenieria ambiental* , vol. A.A 4976, 2000.
- [2] A. P. Preciado, El Problema del rio Bogota, 2000.
- [3] P. Freddy Pantoja Timarán, TECNOLOGÍAS APROPIADAS PARA DISMINUIR LA CONTAMINACIÓN OCASIONADA POR MERCURIO EN LA MINERÍA DEL ORO, Pasto Colombia: CORPONARIÑO-COLCIENCIAS. A.A. 1476, 2001.
- [4] A. G. López, «LA PREOCUPACIÓN POR LA CALIDAD DEL MEDIO AMBIENTE. UN MODELO COGNITIVO SOBRE LA CONDUCTA ECOLÓGICA,» UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID , MADRID, 2002.
- [5] R. O. Cañazares-Villanueva, «Biosorcion de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana,» *Revista latinoamerica de Microbiologia*, nº 42, pp. 131-143, 2000.
- [6] K. Eto, Minamata disease. Neuropathology, 2000.
- [7] EPA, «EPA mercury study report to congress,» 1997. [En línea]. Available: [www.epa.gov/ttn/oarpg/t3/reports/volume5.pdf](http://www.epa.gov/ttn/oarpg/t3/reports/volume5.pdf).
- [8] M. G. Hernandez, «Aislamiento e identificacion de hongos filamentosos tolerantes a metales pesados en el proceso de lodos activados en una planta de tratamientos de agua residual,» UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON, 2004.
- [9] X. G. Martinez, El mercurio como contaminante global desarrollo de metodologias para su determinacion en suelos contaminados y estrategias para la reduccion de su liberacion en el medio ambiente, Barcelona: Universidad Autonoma de Barcelona , 2004.
- [10] D. S. L. Carrera Alvarado Nicte Xchebelyax, «REMOCIÓN DE METALES PESADOS POR MÉTODOS FÍSICOQUÍMICOS PRESENTES EN AGUA PROVENIENTE DE UNA INDUSTRIA MINERA,» *Sistemas Ambientales*, vol. 5, nº 1, pp. 27-40, 2012.
- [11] Analí MACHADO<sup>1</sup>, Neyma GARCÍA<sup>1</sup>, César GARCÍA<sup>1</sup>, Lorena ACOSTA<sup>1</sup>, Alberto CÓRDOVA<sup>1</sup>, María LINARES<sup>1</sup>, Debora GIRALDOTH<sup>1</sup> y Harvi VELÁSQUEZ<sup>2</sup>, «Contaminación por metales (Pb, Zn, Ni y Cr) en aire, sedimentos viales y suelo en una zona de alto tráfico vehicular,» *Revista internacional de contaminación ambiental*, vol. 24, nº 4, 2008.
- [12] L. I. A. MANOSALVA, «Remoción de metales pesados por medio de adsorbentes no

convencionales,» UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA, Temuco, 2008.

- [13] Alcaldia de villapinzon, [En línea]. Available: [http://villapinzon-cundinamarca.gov.co/mapas\\_municipio.shtml?apc=bcxx-1-&x=1498440](http://villapinzon-cundinamarca.gov.co/mapas_municipio.shtml?apc=bcxx-1-&x=1498440). [Último acceso: 12 03 2015].
- [14] A. d. choconta, «Alcaldia de Choconta Cundinamarca,» 20 3 2012. [En línea]. Available: [http://www.choconta-cundinamarca.gov.co/informacion\\_general.shtml](http://www.choconta-cundinamarca.gov.co/informacion_general.shtml). [Último acceso: 12 08 2014].
- [15] alcaldia de choconta , [En línea]. Available: [http://www.choconta-cundinamarca.gov.co/mapas\\_municipio.shtml?apc=bcMapas%20Pol%EDticos-1-&x=3057548](http://www.choconta-cundinamarca.gov.co/mapas_municipio.shtml?apc=bcMapas%20Pol%EDticos-1-&x=3057548). [Último acceso: 12 03 2015].
- [16] RCN, «Rios del bajo cauca antioqueno, los mas contaminados de colombia por mercurio,» RCN Radio , 01 11 2012. [En línea]. Available: <http://www.rcnradio.com/noticias/rios-del-bajo-cauca-antioqueno-los-mas-contaminados-de-colombia-por-mercurio-30553>. [Último acceso: 2013].
- [17] B. J. r. Jesus Oliveiro Verbel, «El lado gris de la mineria del oro,» Alpha impresiones Ltda, cartagena , 2002.
- [18] W. F. a. F. M. R.P Manson, «Geochimica et Cosmochimica,» 1994, pp. 3191-3198.
- [19] w. h. organization, «environmental health criteria 118: inorganic mercury,» geneva , 1991.
- [20] P. d. l. n. unidas, Análisis del flujo del comercio y revisión de practicas de manejo ambientalmente racionales de productos conteniendo cadmio, plomo y mercurio en América Latina y el Caribe, 2010.
- [21] D. R. P. N, «Toxicologia clinica veterinaria,» 2014. [En línea]. Available: <http://www.ropana.cl/toxivet/Mercurio.htm>. [Último acceso: 11 08 2014].
- [22] WHO, Environmental healt criteria 101 (IPCS) methylmercury, Geneva : World health organization , 1990.
- [23] I. P. Antuna, «estudio de nivel de mercurio en aguas superficiales del arroyo saladillo,» santa fe argentina , 2007 .
- [24] T. A., Plan de manejo ambiental regional para la pequeña minería de oro de aluvión y filón en el Sur del Departamento de Bolívar, Cartagena: Corporacion Autónoma Regional del Sur de Bolivar, 1997.
- [25] R. V. Vargas, «Eliminacion de metales pesados de agua subterranea mediante sistemas de lechos

sumergidos,» 2005.

- [26] K. Rodriguez, «Eficacia del hongo *Pleurotus ostreatus* como biorremediador de suelos contaminados con metales pesados,» Universidad de puerto rico, Puerto rico , 2005.
- [27] E. D. R. Toriz, Remocion de metales pesados con carbon activado como soporte de biomasa, Mexico: UANL.
- [28] A. E. Navarro, «ELUCIDACION DEL EFECTO DEL pH EN LA ADSORCIÓN DE METALES PESADOS MEDIANTE BIOPOLÍMEROS NATURALES: CATIONES DIVALENTES Y SUPERFICIES ACTIVAS,» *Revista Iberoamericana de Polímeros*, vol. Volumen 7(2), 2006.
- [29] M. A. T. y. E. A. Cintia Elizabeth Paisio\*Paola Solange González, «Remediación biológica de Mercurio: Recientes avances,» Universidad Nacional de Río Cuarto, 2012.
- [30] PNUMA, «El uso del mercurio en la mineria del oro artesanal y en pequeña escala,» [En línea]. Available:  
[http://www.mesadedialogopermanente.org/Mesa\\_de\\_Dialogo\\_Permanente/Mesa\\_de\\_Dialogo\\_Permanente/documentos\\_files/MERCURIO%20EN%20LA%20MINERIA%20DEL%20ORO%20MODULO%203.pdf](http://www.mesadedialogopermanente.org/Mesa_de_Dialogo_Permanente/Mesa_de_Dialogo_Permanente/documentos_files/MERCURIO%20EN%20LA%20MINERIA%20DEL%20ORO%20MODULO%203.pdf). [Último acceso: 22 11 2013].
- [31] G. maps, «Google,» [En línea]. Available: [https://maps.google.com/maps?q=villapinzon&ie=UTF-8&hq=&hnear=0x8e4023e543f3cf5d:0x95f5f978a5a36448,Villapinz%C3%B3n,+Cundinamarca&gl=co&ei=cLOgUozXLsL\\_kAet84GADw&ved=0CI0BELYD](https://maps.google.com/maps?q=villapinzon&ie=UTF-8&hq=&hnear=0x8e4023e543f3cf5d:0x95f5f978a5a36448,Villapinz%C3%B3n,+Cundinamarca&gl=co&ei=cLOgUozXLsL_kAet84GADw&ved=0CI0BELYD).
- [32] R. Á.-L. NÉSTOR JAVIER MANCERA-RODRÍGUEZ, «ESTADO DEL CONOCIMIENTO DE LAS CONCENTRACIONES DE MERCURIO Y OTROS METALES PESADOS EN PECESDULCEACUÍCOLAS DE COLOMBIA,» *Acta Biológica Colombiana*, vol. 11, nº 1, pp. 3-23, 2006.
- [33] B. Muneer, Role of microorganisms in remediation of heavy metals in the Wastewater of Tanneries, Pakistan : University of the punjab , 2005.
- [34] T. A. VERÓNICA CAÑEDO, «Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos.,» Centro Internacional de la Papa, Lima Peru, 2004.
- [35] R. O. CAÑIZARES, «Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana,» *Revista Latinoamericana de Microbiología*, vol. 42, pp. 131-143, 2000.
- [36] T. L. J. B. M. A. Eduardo Soto, «Remocion de metales pesados en aguas residuales mediante agentes quimicos,» *Ingenierias*, vol. VII, nº 23, 2004.

- [37] J. L. M. N. I. D. U. C. Juan Gabriel Sánchez Castellón<sup>1</sup>, «Remoción de plomo, cadmio y mercurio en un efluente minero por medio de biomasa de hongos *Penicillium* sp.,» *Memorias del II Seminario de Ciencias Ambientales Sue-Caribe & VII Seminario Internacional de Gestión Ambiental*, vol. II, pp. 151-154, 2014.
- [38] D. B. S. Nava, *Evaluación del potencial de inmovilización de mercurio aplicado a la biorremediación de efluentes por medio de bacterias anaerobias aisladas de sedimentos del Río Bogotá.*, bogota , 2013.
- [39] A. M. W. S. A. T. S. R. a. M. K. R. Amir Shafeeq, «Mercury Removal Techniques for Industrial Waste Water,» *World Academy of Science, Engineering and Technology*, vol. 6, nº 12, pp. 1164-1167, 2012.
- [40] M. D. C. V. RODRÍGUEZ, «ORGANISMOS FILAMENTOSOS Y SU RELACIÓN CON LA DEGRADACIÓN DE MATERIA ORGÁNICA Y NUTRIENTES BAJO CONDICIONES ESPECÍFICAS DE OPERACIÓN.,» UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, Mexico D.F, 2006.
- [41] S. G. A. R.-L. G.-R. Catherine Soto<sup>1</sup>, «Biotransformación de metales pesados presentes en lodos ribereños de los ríos Bogotá y Tunju,» *Universidad Antonio Nariño*, pp. 195-205, 2010.
- [42] M. d. t. y. a. s. espana, «Determinación de mercurio en orina - Método del vapor frío con borohidruro de sodio,» espana, 2014.
- [43] D. N.E.A, mercury accumulation in fish from Madre de Dios, a gold mining area in amazon basin, Peru.Thesis for master of science, Oregon , 1997.
- [44] B. J.A, A new wastewater treatment and metal recovery technology, Lawrance , 1986.
- [45] P. Ozuah, Folk use of elemental mercury: a potential hazard for, Natl. Med. Assoc, 2001.
- [46] S. Counter, Elevated blood mercury and neuro-otological observations in children of the Ecuadorian gold mines., *Toxicol. Environ. Health A.*, 2002.
- [47] A. y. G. F. Cavalleri, Reversible color vision loss in occupationally exposure to metallic mercury, *Environ. Res.SectionA.77*, 1998.
- [48] J. G. F. S. P. H. J. y. G. J. Zimmer, Mercury erythema after accidental exposure to mercury vapor., paris: *Ann. Med. Interne*, 1997.
- [49] N. y. F. R. Langford, Toxicity of mercury., *J. Hum. Hypertens.*, 1999.

- [50] J. P. H. Association, Preventive Measures against Environmental Mercury Pollution and its Health Effects., Minamata, 2001.
- [51] A. Mentaberry, *Agrobiotecnología*, Buenos aires: Universidad de buenos aires, 2001.
- [52] UDLAP, «catrina udlap mexico,» [En línea]. Available:  
[http://catarina.udlap.mx/u\\_dl\\_a/tales/documentos/mbt/maqueda\\_g\\_ap/capitulo4.pdf](http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/mbt/maqueda_g_ap/capitulo4.pdf).  
 [Último acceso: 4 Febrero 2013].
- [53] A. E, Un metodo de gestion ambiental adecuado para el tratamiento y la disposicion final de un residuo peligroso, Medellin: Universidad Nacional de Colombia , 2010.
- [54] M. J. A. a. M. I. B. Humaira Khan, «A Simple spectrohotometric determination of trace level mercury using 1.5 Diphenylthiocarbazone solubilized in micelle,» University of Sindh, Jamshoro pkistan, 2005.
- [55] P. Marcello Veiga, Antioquia, Colombia: the world's most polluted place by mercury: impressions from two field trips, UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA, 2010.
- [56] A. V. A. J. M. V. M. R. A. G. C. J. R. C. C. G. Turizo, Plan de manejo ambiental regional para la pequeña minería de oro de aluvión y filón en el Sur del Departamento de Bolívar, Cartagena: Corporacion Autónoma Regional del Sur de Bolivar, 1997.
- [57] S. d. P. d. I. salud, «www.tunutricionista.es,» [En línea]. Available:  
<http://www.serviciodepromociondelasalud.es/articulos/572-metales-pesados-y-pescado>.
- [58] M. d. r. exteriores, «Cancilleria,» 10 10 2013. [En línea]. Available:  
<https://cancilleria.gov.co/newsroom/news/colombia-firmo-tratado-ambiental-sobre-utilizacion-del-mercurio>. [Último acceso: 22 11 2013].
- [59] C. d. colombia, «ley 1658 de 2013,» 2013.
- [60] R. d. colombia, «Decreto 1594 de 1984,» 1984.
- [61] [En línea]. Available:  
[http://binational.pharmacy.arizona.edu/sites/binational.pharmacy.arizona.edu/files/all\\_files/Bioem-MP.pdf](http://binational.pharmacy.arizona.edu/sites/binational.pharmacy.arizona.edu/files/all_files/Bioem-MP.pdf). [Último acceso: 13 03 2015].
- [62] \*. H. v. C. ., Y. L. ., K. N. T. ., a. W.-D. D. ‡. Irene Wagner-Döbler, «Removal of Mercury from Chemical Wastewater by Microorganisms in Technical Scale,» *ACS Publications* , nº 34, pp. 4628-4634, 2000.



## 14. ANEXOS.

Los siguientes anexos hacen parte a los resultados obtenidos por la empresa Analquim LTDA, quien fue la que realizó la medición con espectrofotometría del mercurio presente en los ensayos de laboratorio.

Para analizar la capacidad de remoción de los hongos se acudió a un tercero, el laboratorio Analquim ubicado en la ciudad de Bogotá D.C., laboratorio avalado por el IDEAM que Analizó las muestras de los hongos objetos de estudio con la concentración de (9 µg/l), para esto se empleó la siguiente metodología:

- Reactivos
  - Solución madre de Cu de 1000 µg/ml
  - Soluciones hijas en agua milli-Q de Cu de 100 y 10 µg/ml
  - Agua milli-Q system
  - Ácido Tricloroacético (TCA)
- Materiales
  - Pipetas automáticas de 0-50 µl, 50-200 µl, 200-1000 µl y 0-5 ml
  - Espectrofotómetro de Absorción Atómica Perkin-Elmer Mod. 560
- Procedimientos
  - Construir una curva patrón a partir de la solución hija de Cu de 10 µg/ml, con los siguientes patrones: 0, 0.625, 1.25 y 2.5 µg/ml.
  - Diluir las muestras (1/2) con agua milli-Q
  - Un método alternativo (se empleará en casos de muestra con depósitos o no cristalino) consiste en adicionar a 1 ml de muestra, 1 ml de Ácido Tricloroacético (TCA) al 24%. A continuación se calienta durante 15 minutos a 90°C en placa calefactora y posteriormente se centrifuga a 3500 rpm / 20 minutos. En este caso, el diluyente empleado en la curva patrón será, en lugar de agua milli-Q, TCA al 12%.
- Cálculos
  - Determinación de la concentración de mercurio en la curva de calibración, la concentración de mercurio en cada muestra, expresada en µg/ml, se determina directamente por interpolación de la lectura obtenida, restando previamente el blanco de reactivos 6.3.3., en la curva de calibración.
  - Determinación de la concentración de mercurio en la muestra, los resultados, expresados en microgramos de mercurio por litro (µg Hg/l) se obtienen mediante la siguiente expresión:  $C = c \times 1000$  donde: C es la concentración de mercurio en la muestra en µg Hg/l. c es la concentración de mercurio en µg Hg/ml, leída en la curva de calibración.

- Precisión

El sesgo del método ha sido evaluado mediante la utilización de Materiales de Referencia La tabla muestra los resultados de esta prueba.

| Material de referencia | Concentración certificada | Resultados obtenidos           |         |           |
|------------------------|---------------------------|--------------------------------|---------|-----------|
|                        |                           | Concentración $\mu\text{g/ml}$ | C.V (%) | Sesgo (%) |
| Nivel I                | 43+/-8                    | 43.9                           | 2.8     | 2.1       |
| Nivel II               | 145+/-29                  | 149.2                          | 1.3     | 2.9       |

Tabla 8: precisión de laboratorio.

El coeficiente de variación del método calculado a partir de los datos intralaboratorio según se especifica en 9.8 resultó ser inferior al 3% en el intervalo de concentraciones ensayado.

Límite de detección, el límite de detección del método calculado siguiendo el criterio de la IUPAC como la concentración correspondiente a tres veces la desviación típica de una serie de lecturas correspondientes a diferentes muestras en blanco ( $n=10$ ) resultó ser de 2  $\mu\text{g/ml}$  de muestra. El límite de cuantificación definido por la misma IUPAC como la concentración correspondiente a 10 veces dicha desviación típica es de 5  $\mu\text{g/ml}$  de muestra.

El intervalo de trabajo va desde 3  $\mu\text{g Hg/l}$  a 200  $\mu\text{g Hg/l}$  de muestra. [38]



**CÓDIGO: 85367**

PÁGINA: 1 de 1

SEÑOR(ES): JAIME ALBERTO VERA RODRÍGUEZ

**DIRECCIÓN:**

TELÉFONO: 3015279752

MUESTRA PROCEDENTE DE :

VILLAPINZON

DEPARTAMENTO: CUNDINAMARCA

LUGAR TOMA DE LA MUESTRA:

## VILLA PINZON

PUNTO DE CAPTACIÓN:

006 - RIO BOGOTÁ

TIPO DE MUESTRA :

### AGUA RESIDUAL DOMESTICA

FECHA DE TOMA DE LA MUESTRA:

31-MAY-2014

HORA TOMA DE LA MUESTRA: 10:00 AM

FECHA RECEPCIÓN DE LA MUESTRA:

20-JUN-2014

## RESULTADOS

| RESULTADOS  |                |                  |            |               |
|-------------|----------------|------------------|------------|---------------|
| ENSAYO      | FECHA-ANALISIS | MÉTODO           | REFERENCIA | RESULTADO     |
| a. MERCURIO | 25-JUN-2014    | A.A - Vapor frío | SM 3112 B  | 0.004 mg/L Hg |

## FIN DEL REPORTE

**OBSERVACIONES:** Muestra puntual recolectada por el cliente.

Referencia (SM): Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22d Edition, 2012.

a. Ensayo(s) de laboratorio acreditado en Analquim Ltda. Resolución de acreditación N° 2656 del 25 de octubre de 2013. IDEAM

El presente documento es válido únicamente si tiene el sello seco.

**NOTA:**

Los resultados del presente informe hacen referencia únicamente a la muestra analizada.

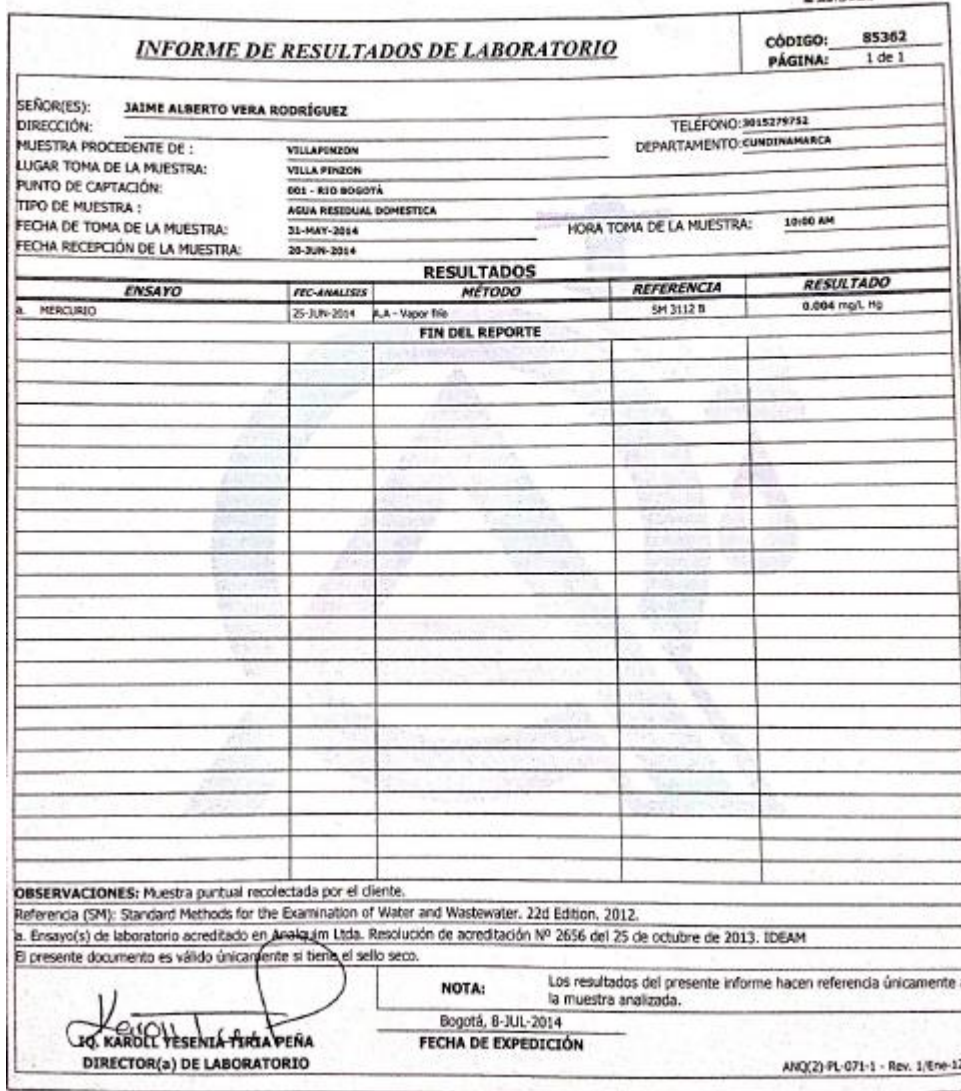
Bogotá, 8-JUL-2014

FECHA DE EXPEDICIÓN

**IQ. KAROLL YESENIA TIRIA PEÑA**  
**DIRECTOR(a) DE LABORATORIO**

ANO(2)-PL-071-1 - Rev. 1/Ene-12

Cra. 25 No. 73 - 60/66 • Tels.: 630 9945 - 329 1873 - 329 3417 • Administrativa: 703 8006 • Cotizaciones 329 1884 • Contabilidad: 231 6293 • Cels.: 315 771 8638  
315 860 2196 • E-mail: [gerenciacomercial@analquim.com](mailto:gerenciacomercial@analquim.com) - [calidad@analquim.com](mailto:calidad@analquim.com) - [gerencia@analquim.com](mailto:gerencia@analquim.com) • [www.analquim.com](http://www.analquim.com) • Bogotá, D.C. - Colombia



## Anexo 2: remoción hongo 2

# INFORME DE RESULTADOS DE LABORATORIO

CÓDIGO: 85363  
PÁGINA: 1 de 1

SEÑOR(ES): JAIME ALBERTO VERA RODRÍGUEZ

DIRECCIÓN:

TELÉFONO: 3018279752

MUESTRA PROCEDENTE DE:

VILLAPINZON

DEPARTAMENTO: CUNDINAMARCA

LUGAR TOMA DE LA MUESTRA:

VILLA PINZON

PUNTO DE CAPTACIÓN:

002 - RIO BOGOTÁ

TIPO DE MUESTRA:

AGUA RESIDUAL DOMESTICA

FECHA DE TOMA DE LA MUESTRA:

31-MAY-2014

HORA TOMA DE LA MUESTRA: 10:00 AM

FECHA RECEPCIÓN DE LA MUESTRA:

30-JUN-2014

## RESULTADOS

| ENSAYO      | PROC-ANALISIS | METODO            | REFERENCIA | RESULTADO     |
|-------------|---------------|-------------------|------------|---------------|
| 6. MERCURIO | 25-JUN-2014   | J.A. - Vapor frío | SM 3112 B  | 0.003 mg/L Hg |

FIN DEL REPORTE

OBSERVACIONES: Muestra puntual recolectada por el cliente.

Referencia (SM): Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22d Edition, 2012.

a. Ensayo(s) de laboratorio acreditado en Asigqual Ltda. Resolución de acreditación N° 2656 del 25 de octubre de 2013. IDEAM

El presente documento es válido únicamente si tiene el sello seco.

NOTA:

Los resultados del presente informe hacen referencia únicamente a la muestra analizada.

Bogotá, 8-JUL-2014

FECHA DE EXPEDICIÓN

DR. KAROL YSSENIA TORJA PEÑA  
DIRECTOR(a) DE LABORATORIO

ANQ(2)-PL-071-1 - Rev. 1/Ene-14

### Anexo 3: remoción hongo 3



**ANALQUIM LTDA.**  
ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS Y CALIDAD DEL AIRE



| INFORME DE RESULTADOS DE LABORATORIO                                                                                         |                |                                                                                                                                            |            |               | CÓDIGO: 85364  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|---------------|----------------|
|                                                                                                                              |                |                                                                                                                                            |            |               | PÁGINA: 1 de 1 |
| SEÑOR(ES): JAIME ALBERTO VERA RODRÍGUEZ                                                                                      |                |                                                                                                                                            |            |               |                |
| DIRECCIÓN:                                                                                                                   |                | TELÉFONO: 3913279752                                                                                                                       |            |               |                |
| MUESTRA PROCEDENTE DE:                                                                                                       |                | DEPARTAMENTO: CUNDINAMARCA                                                                                                                 |            |               |                |
| LUGAR TOMA DE LA MUESTRA:                                                                                                    |                | VILLAPINZON                                                                                                                                |            |               |                |
| PUNTO DE CAPTACIÓN:                                                                                                          |                | 003 - #30 BOGOTÁ                                                                                                                           |            |               |                |
| TIPO DE MUESTRA:                                                                                                             |                | AGUA RESIDUAL DOMESTICA                                                                                                                    |            |               |                |
| FECHA DE TOMA DE LA MUESTRA:                                                                                                 |                | 31-MAY-2014                                                                                                                                |            |               |                |
| FECHA RECEPCIÓN DE LA MUESTRA:                                                                                               |                | 30-JUN-2014                                                                                                                                |            |               |                |
| HORA TOMA DE LA MUESTRA:                                                                                                     |                | 10:00 AM                                                                                                                                   |            |               |                |
| RESULTADOS                                                                                                                   |                |                                                                                                                                            |            |               |                |
| ENSAYO                                                                                                                       | FECHA ANALISIS | MÉTODO                                                                                                                                     | REFERENCIA | RESULTADO     |                |
| 1. MERCURIO                                                                                                                  | 25-JUN-2014    | A.A. - Vapor Trío                                                                                                                          | SM 3112 B  | 0.004 mg/L Hg |                |
| FIN DEL REPORTE                                                                                                              |                |                                                                                                                                            |            |               |                |
| OBSERVACIONES: Muestra puntual recolectada por el cliente.                                                                   |                |                                                                                                                                            |            |               |                |
| Referencia (SM): Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22nd Edition, 2012.                           |                |                                                                                                                                            |            |               |                |
| a. Ensayo(s) de laboratorio acreditado en Analquim Ltda. Resolución de acreditación N° 2656 del 25 de octubre de 2013. IDEAM |                |                                                                                                                                            |            |               |                |
| El presente documento es válido únicamente si tiene el sello seco.                                                           |                |                                                                                                                                            |            |               |                |
| JQ. KAROL YESENIA TAPIA PEÑA<br>DIRECTOR(a) DE LABORATORIO                                                                   |                | NOTA: Los resultados del presente informe hacen referencia únicamente a la muestra analizada.<br>Bogotá, 8-JUL-2014<br>FECHA DE EXPEDICIÓN |            |               |                |
|                                                                                                                              |                | AVQ(2)-PL-071-1 - Rev. 1/Ene-12                                                                                                            |            |               |                |

Cra. 25 No. 72 - 60/66 • Tels.: 630 9945 - 329 1873 - 329 3417 • Administrativa: 702 8006 • Cotizaciones 329 1884 • Contabilidad: 231 6253 • Cel.: 315 771 8538

Anexo 4: remoción hongo 4



# **INFORME DE RESULTADOS DE LABORATORIO**

CÓDIGO: 85365  
PÁGINA: 1 de 1

SEÑOR(ES): **JAIIME ALBERTO VERA RODRÍGUEZ**

DIRECCIÓN:

TELÉFONO: 3015278752

MUESTRA PROCEDENTE DE :

DEPARTAMENTO: CUNDINAMARCA

LUGAR TOMA DE LA MUESTRA:

VILLAPINZON

PUNTO DE CAPTACIÓN:

VILLA PINZON

TIPO DE MUESTRA :

004 - RIO BOGOTÁ

FECHA DE TOMA DE LA MUESTRA:

AGUA RESIDUAL DOMESTICA

HORA TOMA DE LA MUESTRA: 10:00 AM

FECHA RECEPCIÓN DE LA MUESTRA:

31-MAY-2014

20-JUN-2014

## **RESULTADOS**

| ENSAYO      | FECH ANALISIS | MÉTODO           | REFERENCIA | RESULTADO     |
|-------------|---------------|------------------|------------|---------------|
| 9. MERCURIO | 25-JUN-2014   | A.A - Vapor frío | SM 3112 B  | 0.004 mg/L Hg |

## **FIN DEL REPORTE**

OBSERVACIONES: Muestra puntual recolectada por el cliente.

Referencia (SM): Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 22d Edition, 2012.

a. Ensayo(s) de laboratorio acreditado en Analquim Ltda. Resolución de acreditación N° 2656 del 25 de octubre de 2013. IDEAM

El presente documento es válido únicamente si tiene el sello seco.

NOTA:

Los resultados del presente informe hacen referencia únicamente a la muestra analizada.

Bogotá, 8-JUL-2014

FECHA DE EXPEDICIÓN

ANQ(2)-PL-071-1 - Rev. 1/Ene-12

**DIRECTOR(a) DE LABORATORIO**

## Anexo 5: remoción hongo 5



# **INFORME DE RESULTADOS DE LABORATORIO**

CÓDIGO: 85366  
PÁGINA: 1 de 1

SEÑOR(ES): **JAIME ALBERTO VERA RODRÍGUEZ**

DIRECCIÓN:

TÉLEFONO: 3845279753

MUESTRA PROCEDENTE DE :

VILLAPINZON

DEPARTAMENTO: CUNDINAMARCA

LUGAR TOMA DE LA MUESTRA:

VILLA PINZON

PUNTO DE CAPTACIÓN:

005 - RIO BOGOTÁ

TIPO DE MUESTRA :

AGUA RESIDUAL DOMESTICA

FECHA DE TOMA DE LA MUESTRA:

31-MAY-2014

HORA TOMA DE LA MUESTRA: 10:00 AM

FECHA RECEPCIÓN DE LA MUESTRA:

20-JUN-2014

## **RESULTADOS**

| ENSAYO      | FEC-ANALISIS | METODO          | REFERENCIA | RESULTADO     |
|-------------|--------------|-----------------|------------|---------------|
| A. MERCURIO | 25-JUN-2014  | A.A - Vapor Sol | SP 3312 B  | 0.003 mg/L Hg |

## **FIN DEL REPORTE**

OBSERVACIONES: Muestra puntual recolectada por el cliente.

Referencia (SM): Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22d Edition, 2012.

A. Ensayo(s) de laboratorio acreditado en Analquim Ltda. Resolución de acreditación N° 2656 del 25 de octubre de 2013. IDEAM

El presente documento es válido únicamente si tiene el sello seco.

NOTA:

Los resultados del presente informe hacen referencia únicamente a la muestra analizada.

Bogotá, 8-JUL-2014

FECHA DE EXPEDICIÓN

ANQ(2)-PL-071-1 - Rev. 3/Ene-12

**DIRECTOR(a) DE LABORATORIO**

## Anexo 6: remoción hongo 6