



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE GUAYAQUIL**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD REMOVEDORA DE METALES
PESADOS (CR, CD, AS) EMPLEANDO TAXONES DE HONGOS
FILAMENTOSOS AISLADOS DE SEDIMENTOS MARINOS DEL
GOLFO DE GUAYAQUIL, ECUADOR**

Trabajo de titulación previo a la obtención del
Título de Ingeniero/a en Biotecnología

AUTORES:

KATHIA JUMARY ROMERO MENOSCAL
EMILY ALEJANDRA BUSTAMANTE SALAZAR

TUTORA:

CARINA ELIZABETH HIDALGO RAMÍREZ, Msc.

Guayaquil – Ecuador

2023


CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN


Nosotras, Kathia Jumary Romero Menoscal con documento de identificación N° 0958965337 y Emily Alejandra Bustamante Salazar con documento de identificación N° 0951714070; manifestamos que:

Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Guayaquil, 07 de septiembre del año 2023.

Atentamente,


Kathia Jumary Romero Menoscal
0958965337


Emily Alejandra Bustamante Salazar
0951714070

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL
TRABAJO DE TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA
SALESIANA**

Nosotros, Kathia Jumary Romero Menoscal con documento de identificación N° 0958965337 y Emily Alejandra Bustamante Salazar con documento de identificación N° 0951714070; expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del Trabajos Experimentales: “Evaluación de la capacidad removedora de metales pesados (Cr, Cd, As) empleando taxones de hongos filamentosos aislados de sedimentos marinos del Golfo de Guayaquil, Ecuador”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniero/a en Biotecnología, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 07 de septiembre del año 2023.

Atentamente,



Kathia Jumary Romero Menoscal
0958965337



Emily Alejandra Bustamante Salazar
0951714070

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Carina Elizabeth Hidalgo Ramírez con documento de identificación N° 1722655519, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: “Evaluación de la capacidad removedora de metales pesados (Cr, Cd, As) empleando taxones de hongos filamentosos aislados de sedimentos marinos del Golfo de Guayaquil, Ecuador”, realizado por Kathia Jumary Romero Menoscal con documento de identificación N° 0958965337 y por Emily Alejandra Bustamante Salazar con documento de identificación N° 0951714070, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajos Experimentales que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 07 de septiembre del año 2023.

Atentamente,



Carina Elizabeth Hidalgo Ramírez

1722655519

DEDICATORIA

El presente estudio se lo dedico a mi familia por ser el hogar más cálido y reconfortante que conozco, quienes me acompañaron durante todo el proceso de mi carrera universitaria.

A mi madre, Sara Sofía Salazar Estéfano, por ser mi mejor amiga, confidente y apoyo más grande durante toda mi vida. A mi padre, Ángel Anibal Bustamante Intriago, por acompañarme en cada paso que doy y siempre tener un consejo para mí.

A mi mamita, Sara María Estéfano Cantillo, por apoyarme en todas mis decisiones y ser mi ejemplo por seguir. A mi tía, Lorena Jessenia Salazar Estéfano, por formar parte de cada evento de mi vida y compartir el amor por la ciencia.

Emily Alejandra Bustamante Salazar

Le dedico el resultado de este trabajo a Dios, quién me brindó fuerzas cuando más lo necesité y estuvo junto a mí en todo momento para guiarme de su mano con mucho amor y sabiduría.

A mi querida madre Silvia Menoscal y a mi adorado padre Milton Romero que siempre confiaron en mí y estuvieron pendientes desde el inicio de mi carrera universitaria hasta el final de esta maravillosa etapa, apoyándome, llenándome de dicha y alegría porque son los mejores padres del universo y gracias a ellos ahora puedo culminar un propósito más en mi vida.

A mi lindo hermano, enamorado, tíos (as), primos (as) y toda mi familia que estuvo conmigo alentándome incondicionalmente con consejos y palabras motivadoras que hicieron de mí una mejor persona.

Kathia Jumary Romero Menoscal

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios por ser el guía y pilar de sabiduría de mi vida (Isaías 41:10).

A mi madre, padre, abuela y tías por apoyarme y ser el motor que impulsó toda mi vida universitaria, enseñándome que, con trabajo duro, determinación y disciplina se logran alcanzar las metas. A mis primos y amigos que me brindaron fuerzas durante toda esta etapa y a la música por ser mi refugio.

A mi compañera Kathia Romero por ser una hermana y amiga sincera desde que nos conocimos, con quien compartí risas y tristezas durante toda la aventura del proyecto de titulación.

Muchas gracias a mi tutora de tesis, Msc. Carina Hidalgo, por la paciencia, amabilidad y predisposición que tuvo con nosotras, a mi cotutor, Ing. Kevin Cedeño, por ayudarnos en cada paso que dimos durante esta aventura y siempre hacerme reír.

Un agradecimiento fuerte a todas las personas que estuvieron presentes de forma directa e indirecta en mi proceso de titulación, brindándome su afecto y energía.

Emily Alejandra Bustamante Salazar

Quiero agradecerles a todas las personitas lindas que estuvieron conmigo durante el desarrollo de esta investigación.

A su vez, agradecerle a la Universidad Politécnica Salesiana y a todo el cuerpo docente de la carrera de Biotecnología por su ayuda indispensable para culminar con éxito mi proyecto de titulación.

Finalmente, quiero agradecerles de manera infinita a mi gran compañera y amiga del alma Emily Bustamante por ser como una hermana e irradiarme de luz con sus buenas energías a todo lo largo de esta trayectoria, a mi tutora Msc. Carina Hidalgo Ramírez y a mi cotutor el Ing. Kevin Cedeño Vínces por la paciencia y dedicación brindada para la obtención de resultados exitosos en este proyecto.

Kathia Jumary Romero Menoscal

RESUMEN

El Golfo de Guayaquil es el estuario más importante de la costa pacífica del Ecuador puesto que engloba áreas de protección ecológica y permite el comercio y desarrollo industrial. No obstante, la actividad antropogénica ha provocado la contaminación del Golfo induciendo al aumento de concentraciones de contaminantes, en especial de metales pesados que sobrepasan los límites permisibles y provocan afecciones en el ecosistema y la salud humana. La investigación tiene por objetivo el aislamiento de taxones de hongos con potencial de remoción de metales pesados (Cr, Cd, As) para la biorremediación de sedimentos marinos en el Golfo de Guayaquil, Ecuador. La metodología consiste en la cuantificación de metales mediante la técnica ICP-OES, aislamiento, aclimatación, resiembra e identificación del taxón, y la evaluación del grado de remoción de contaminantes mediante tratamientos experimentales. Los resultados obtenidos demuestran presencia elevada de iones metálicos, en especial Cr (43 ppm); un aislamiento de hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium*; y un resultado positivo en la disminución de contaminante del 77,08% Cd, 70,98% Cr y 9,60% As. Sin embargo, la efectividad del tratamiento se ve regido por las condiciones ambientales y el uso individual de los agentes fúngicos en contraste con un consorcio de estos. El tratamiento de zonas contaminadas y los efluentes hídricos de industrias son indispensables para preservar el medio ambiente y la integridad de la salud, además, la implementación de microorganismos para la biorremediación, mediante sus mecanismos biológicos, es una técnica más factible en comparación a los tratamientos convencionales por sus ventajas económicas, resultados a gran escala y no causar efectos secundarios.

Palabras clave: sedimento marino, metales pesados, *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, ICP-OES.

ABSTRACT

The Gulf of Guayaquil is the most important estuary on the Pacific coast of Ecuador since it includes areas of ecological protection and allows trade and industrial development. However, anthropogenic activity has caused contamination of the Gulf, inducing an increase in concentrations of pollutants, especially heavy metals that exceed permissible limits and cause effects on the ecosystem and human health. The objective of the research is the isolation of fungal taxa with the potential to remove heavy metals (Cr, Cd, As) for the bioremediation of marine sediments in the Gulf of Guayaquil, Ecuador. The methodology consists of the quantification of metals through the ICP-OES technique, isolation, acclimatization, replanting and identification of the taxon, and the evaluation of the degree of removal of contaminants through experimental treatments. The results obtained show a high presence of metal ions, especially Cr (43 ppm); an isolate of fungi from the genera *Aspergillus* and *Penicillium*; and a positive result in the reduction of contaminants of 77.08% Cd, 70.98% Cr and 9.60% As. However, the effectiveness of the treatment is determined by environmental conditions and the individual use of fungal agents in contrast to the use of a consortium. The treatment of contaminated areas and industrial water effluents are essential to preserve the environment and the integrity of health, in addition, the implementation of microorganisms for bioremediation, through its biological mechanisms, is a more effective technique compared to conventional treatments for its economic advantages, large-scale results and the fact they do not cause side effects in the environment.

Keywords: marine sediment, heavy metals, *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, ICP-OES.

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. Introducción	16
1.1 Antecedentes	16
1.2 Planteamiento del problema	17
1.3 Pregunta de investigación	18
1.4 Justificación del estudio	18
1.5 Delimitación	19
1.6 Objetivo general y específicos	19
<i>1.6.1 Objetivo general</i>	19
<i>1.6.2 Objetivos específicos</i>	20
1.7 Hipótesis	20
Capítulo 2	21
2. Marco teórico	21
2.1 Golfo de Guayaquil	21
<i>2.1.1 Puerto “El Morro”</i>	21
<i>2.1.2 Puerto “Posorja”</i>	22
2.2 Metales pesados	22
<i>2.2.1 Cadmio</i>	22
<i>2.2.2 Arsénico</i>	23
<i>2.2.3 Cromo</i>	23
2.3 Sedimento marino	24
<i>2.3.1 Límites permisibles de metales pesados en sedimentos marinos</i>	24
2.4 Hongos filamentosos	24
2.5 Biorremediación	25
<i>2.5.1 Hongos biorremediadores</i>	25
2.6 Determinación de metales pesados mediante la tecnología ICP-OES	26

Capítulo 3.....	28
3. Materiales y métodos.....	28
3.1 Diseño experimental.....	28
3.2 Población y muestra.....	28
3.3 Variables.....	28
3.3.1 Variable dependiente.....	28
3.3.2 Variable independiente.....	28
3.4 Técnicas de procesamiento, recolección y análisis de datos.....	29
3.4.1 Procesamiento y recolección de datos.....	29
3.4.2 Procesamiento y análisis de datos.....	29
3.5 Procedimientos.....	29
3.5.1 Recolección de muestras de sedimento marino.....	29
3.5.2 Análisis fisicoquímico de las muestras.....	30
<input type="checkbox"/> Potencial de hidrógeno (pH).....	30
<input type="checkbox"/> Conductividad.....	30
<input type="checkbox"/> Humedad.....	30
3.5.3 Preparación de muestras de sedimento marino para digestión ácida.....	30
<input type="checkbox"/> Secado.....	31
<input type="checkbox"/> Molienda.....	31
<input type="checkbox"/> Tamizaje.....	31
3.5.4 Digestión ácida por microondas bajo la norma EPA 3051.....	31
3.5.5 Determinación de metales pesados mediante la tecnología ICP-OES.....	32
3.5.6 Aislamiento y aclimatación de microorganismos biorremediadores de metales pesados.....	32
<input type="checkbox"/> Preparación de inóculo y siembra.....	32
3.5.7 Resiembra y purificación de colonias de hongos biorremediadores.....	33
<input type="checkbox"/> Resiembra sucesiva para selección definitiva de tres taxones de hongos con potencial biorremediador.....	34

3.5.8 <i>Identificación de taxones de hongos biorremediadores</i>	34
3.5.9 <i>Tratamiento a escala de laboratorio de biorremediación de metales pesados con hongos filamentosos aislados</i>	34
□ Inoculación de hongos filamentosos en el medio de cultivo líquido	35
3.5.10 <i>Digestión abierta</i>	35
3.5.11 <i>Análisis ICP-OES del tratamiento experimental de biorremediación</i>	36
Capítulo 4	37
4. Resultados y discusión	37
4.1 Ubicación de puntos de muestreo	37
4.1.1 <i>Detalles de coordenadas de muestreo en Puerto Posorja</i>	38
4.1.2 <i>Detalles de coordenadas de muestreo en Puerto “El Morro”</i>	40
4.2 Cuantificación de metales pesados en sedimento marinos del Golfo de Guayaquil	41
4.3 Parámetros fisicoquímicos del sedimento marino del Golfo de Guayaquil	45
4.3.1 <i>Humedad</i>	45
4.3.2 <i>pH</i>	47
4.3.3 <i>Conductividad</i>	49
4.4 Aislamiento e identificación de taxones de hongos biorremovedores de metales pesados	51
4.4.1 <i>Medición del halo de crecimiento de hongos</i>	51
4.4.2 <i>Resultados de resiembra en concentración mínima y máxima de contaminantes</i>	55
4.5 Caracterización morfológica e identificación de taxones de hongos	57
4.6 Conteo de esporas para inocular en los tratamientos experimentales	62
4.7 Cuantificación de remoción de metales pesados mediante tratamiento experimental con taxones de hongos	62
4.8 Análisis estadístico des la disminución de metales pesados en el tratamiento experimental	64

Capítulo 5	66
5. Conclusiones y recomendaciones	66
5.1 Conclusiones	66
5.2 Recomendaciones	67
Bibliografía	68
ANEXOS	82

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros de reacción para la digestión ácida de sedimento marino bajo normativa EPA 3051 en digestor CEM MARS 6.	32
Tabla 2. Medios de cultivo PDA suplementado con metales pesados en concentraciones mínimas y máximas.	33
Tabla 3. Ubicación de áreas de muestreo.....	37
Tabla 4. Coordenadas geográficas de los puntos de muestreo en Puerto Posorja.	39
Tabla 5. Coordenadas geográficas de los puntos de muestreo de Puerto “El Morro”.	41
Tabla 6. Concentraciones de Cd, Cr y As en muestras de sedimento marino del Golfo de Guayaquil.....	42
Tabla 7. Valores de humedad de las muestras de sedimento marino de Puerto Posorja y Puerto “El Morro”.....	45
Tabla 8. Datos de pH de las muestras de sedimento marino de Puerto Posorja y Puerto “El Morro”.....	47
Tabla 9. Datos de conductividad de las muestras de sedimento marino por triplicado en Puerto Posorja y Puerto “El Morro”.	49
Tabla 11. Desarrollo de taxones expuestos a concentraciones mínimas y máximas de contaminante.	56
Tabla 12. Crecimiento de taxones de hongos seleccionados para identificación morfológica.	57
Tabla 13. Características morfológicas de los hongos seleccionados para tratamiento de remoción de contaminante Cd.	59
Tabla 14. Características morfológicas de los hongos seleccionados para tratamiento de remoción de contaminantes As.	60
Tabla 15. Características morfológicas de los hongos seleccionados para tratamiento de remoción de contaminantes Cr.....	61
Tabla 16. Células por mililitro para la inoculación de hongos en los tratamientos de remoción de metal pesado.....	62
Tabla 17. Cuantificación de porcentaje de remoción de metales pesados en tratamientos experimentales con hongos.	63

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Delimitación geográfica de la zona de estudio (Golfo de Guayaquil).	37
Figura 2. Delimitación geográfica del Puerto Posorja (Golfo de Guayaquil).	38
Figura 3. Delimitación geográfica de los puntos de muestreo en el Puerto Posorja (Golfo de Guayaquil).....	38
Figura 4. Delimitación geográfica del Puerto “El Morro” (Golfo de Guayaquil).	40
Figura 5. Delimitación geográfica de los puntos de muestreo en el Puerto “El Morro” (Golfo de Guayaquil).....	40
Figura 6. Gráfica de concentración de metales pesados en sedimento marino de Puerto Posorja.	43
Figura 7. Gráfica de concentración de metales pesados en sedimento marino de Puerto “El Morro”.....	43
Figura 8. Gráfica de variaciones de humedad en los puntos de muestreo de Puerto Posorja y Puerto “El Morro”.....	46
Figura 9. Gráfica de comportamiento de los valores de pH en los puntos de muestreo de Puerto Posorja y Puerto “El Morro”.....	48
Figura 10. Gráfica de variaciones de conductividad en los puntos de muestreo de Puerto Posorja y Puerto “El Morro”.....	50
Figura 11. Gráfica de porcentaje de remoción de metales pesados durante el tratamiento experimental con hongos filamentosos.....	63
Figura 12. Análisis estadístico paramétrico T-Student de la disminución de metales pesados en el tratamiento experimental.....	65

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Concentraciones de Cd, Cr y As en muestras de sedimento marino del Golfo de Guayaquil.....	82
Anexo 2. Diámetros de halo de crecimiento de hongos de las muestras de sedimento marino de Puerto Posorja.	83
Anexo 3. Diámetros de halo de crecimiento de hongos de las muestras de sedimento marino de Puerto "El Morro".....	86
Anexo 4. Muestras seleccionadas para resiembra en Cd.....	91
Anexo 5. Muestras seleccionadas para resiembra en Cr.....	91
Anexo 6. Muestras seleccionadas para resiembra en As.	92
Anexo 7. Aclimatación de taxones en concentraciones mínimas y máximas de metales pesados.	92
Anexo 8. Conteo de esporas para inoculación de hongos en tratamiento.	95
Anexo 9. Ecuación para el cálculo de las esporas.	96
Anexo 10. Datos de concentración de metales pesados en muestras digestadas de tratamientos experimentales y de control.	96
Anexo 11. Test de normalidad del As.	97
Anexo 12. Estadística de muestras pareadas del As.	97
Anexo 13. Test de normalidad del Cd.	97
Anexo 14. Estadística de muestras pareadas del Cd.....	98
Anexo 15. Test de normalidad del Cr.....	98
Anexo 16. Estadística de muestras pareadas del Cr.	98

Capítulo 1

1. Introducción

1.1 Antecedentes

El Golfo de Guayaquil, considerado el estuario más grande y relevante de la costa pacífica sudamericana (Union Nations Environment, 2017), es vital para las comunidades pesqueras artesanales que abastecen el mercado nacional. No obstante, la contaminación derivada de actividades humanas como la minería, agricultura e industria ha afectado gravemente esta zona (Navarrete Forero y col., 2019).

Los metales pesados son contaminantes prominentes que pueden tener efectos perjudiciales tanto en la salud humana como en la biodiversidad del ecosistema, debido a esto se pretende eliminar o disminuir las concentraciones de dichos contaminantes mediante metodologías biotecnológicas que permitan reducir su impacto negativo (Goicochea Trelles & García López, 2022).

Según la investigación realizada por Paz Barzola (2021) en los sedimentos del Golfo de Guayaquil durante el período 2019-2021, se encontraron niveles de As, Cu, Cr y Zn que superaban los límites permisibles establecidos a nivel nacional y según la normativa canadiense (ISQG).

Kabata Pendias & Pendias (2001) comentan que estos contaminantes se mueven en la cadena trófica lo que afecta la integridad del ecosistema debido a que las plantas absorben los contaminantes del suelo, luego son consumidas por animales y estos a su vez son ingeridos por los humanos. Por lo tanto, los niveles elevados pueden tener un impacto significativo en la calidad y seguridad de los alimentos, así como en la salud humana (Puga y col., 2006).

Salcedo Martínez y col., (2019) resalta la eficacia de las alternativas biotecnológicas basadas en microorganismos vivos, como bacterias, microalgas y hongos, para la eliminación de contaminantes en el ecosistema, utilizando sus mecanismos biológicos, transformaciones de estado y formación de complejos.

Estas tecnologías tienen la ventaja de ser más económicas, amigables e innovadoras con el medio ambiente en comparación a los procesos fisicoquímicos tradicionales, sin embargo, aún existen desafíos en su implementación a gran escala (Sandoval, 2006).

1.2 Planteamiento del problema

La contaminación de sistemas acuíferos es una problemática común que genera efectos nocivos en la vida silvestre y la salud humana (Cartaya y col., 2008). Esto se debe a que la presencia de diversos contaminantes ha provocado la degradación de la calidad de los recursos hídricos, resultando en un deterioro ambiental (Contreras Pérez y col., 2004).

Los metales pesados de mayor interés, como el cadmio (Cd), cromo (Cr), arsénico (As), mercurio (Hg), entre otros, se encuentran en el ambiente en estado mineral y no son degradados por metabolismos biológicos, puesto que no todos cumplen con dichas funciones (Pabón y col., 2020). Debido a esta característica se facilita el incremento de la presencia de metales pesados en organismos vivos (bioacumulación) generando casos de toxicidad (Prieto Méndez y col., 2009).

Los metales pesados en el Golfo de Guayaquil son un indicador de la mala gestión de los residuos vertidos en zonas acuíferas, provocando afectaciones en la calidad alimenticia, desarrollo de cultivos y salud pública (Mitra y col., 2022). La contaminación por metales pesados es producto de actividades antropogénicas como la minería, agricultura, industria del plástico, conservantes de madera, fabricación de baterías, descargas domésticas e industriales y deposición atmosférica (Pabón y col., 2020).

En la actualidad, se han encontrado altos valores de concentraciones de metales pesados en alimentos como hortalizas, frutas, peces, carnes, leche y mariscos, e incluso se ha reportado valores entre 100 y 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de acumulación de cadmio en moluscos (Reyes y col., 2016).

Los efectos tóxicos a causa de los metales se ven reflejados en forma directa a la cadena trófica debido a las alteraciones en el desarrollo de plantas y las enfermedades que producen en animales y humanos por la bioacumulación de distintos tipos de metales (Mitra y col., 2022).

En el ámbito de la salud humana, las patologías resultantes frente a estos metales se dan al ingerir productos contaminados, por ejemplo, el consumo de alimentos con elevados valores de cobalto (Co) o manganeso (Mn) que producen enfermedades del sistema nervioso, intoxicaciones tanto crónicas como agudas, desarrollos cancerígenos y la disminución de las funciones de órganos (Mejía Sandoval, 2006).

En el ámbito agrícola, el riego de los cultivos con agua sin previo tratamiento podría aumentar las concentraciones de metales en el suelo, en especial en suelos ácidos, en donde el exceso de Al, Hg y Pb resultan tóxicos para las plantas al afectar el crecimiento y el desarrollo de raíces laterales y secundarias (Prieto Méndez y col., 2009).

1.3 Pregunta de investigación

¿Los taxones de hongos aislados de zonas puntuales del Golfo de Guayaquil tienen la posibilidad de remover de metales pesados?

1.4 Justificación del estudio

El proceso de biorremediación empleando agentes fúngicos filamentosos se caracteriza por ser una técnica de fácil aplicabilidad con óptimos resultados, e incluso se ha establecido como una propuesta tentadora para la obtención de un elevado nivel de eliminación de metales tóxicos en comparación a procesos desarrollados con bacterias (Dell'anno y col., 2022).

El proceso metabólico y biorremediador de los hongos filamentosos consta de la producción de enzimas que degradan elementos químicos tóxicos como metales pesados permitiendo su tolerancia y desintoxicación a través de la compartimentación intracelular (Lin y col., 2020). Esta cualidad les permite producir una descontaminación por medio de la segregación y degradación de grandes moléculas orgánicas en moléculas más pequeñas como azúcares, iones minerales, etc., para luego absorberlas por medio de las paredes y membranas de las hifas permitiendo su posterior uso como parte del metabolismo (Lucio Flores y col., 2021).

Los hongos presentan diversos mecanismos de remoción de metales pesados como la bioacumulación, biomineralización, biotransformación y biosorción (Navarro Moreno y col., 2022). A partir de las técnicas mencionadas se puede ejecutar un tratamiento experimental a nivel de laboratorio que permita evaluar la capacidad de disminución de contaminantes por diferentes taxones de hongos y su potencial como agentes biorremediadores (Joshi y col., 2011).

Según las investigaciones realizadas por Chang y col., (2020); Hassan y col., (2020); Pietro Souza y col., (2020) y Talukdar y col., (2020), se evidenció la remoción de diferentes

metales pesados bajo condiciones controladas de los siguientes hongos: *Penicillium* (84% Hg en 7 días a 30°C y pH 5,3), *Basidiomycota* (77% As, 71% Mn, 60% Cr y 52% Cu en 100 días a 28°C y pH 7), consorcio de 4 hongos *Aspergillus*, *Curvularia geniculata*, *Lindgomyces* y *Westerdykella sp.* (57,14% Hg en 14 días a 28°C), *Aspergillus flavus* y *Aspergillus fumigatus* (73% Cr(VI) y 74% Cd(II) en 5 días a 80°C y pH 5) de forma respectiva.

El objetivo de la investigación experimental es analizar la adaptabilidad y establecer tasas de reducción de contaminantes utilizando tres taxones de hongos filamentosos aislados del Golfo de Guayaquil (Lin y col., 2020).

Enfatizar la importancia de profundizar el estudio de metodologías biológicas, amigables y eficientes para la biorremediación con el objetivo de que puedan ser empleadas por organizaciones municipales como medidas de remediación ambiental, protegiendo así, tanto el ecosistema como a las comunidades dependientes de él (Navarrete-Forero y col., 2019).

1.5 Delimitación

Para el aislamiento e identificación de tres taxones de hongos filamentosos con potencial biorremediador se realizará un muestreo en dos zonas del Golfo de Guayaquil: Puerto Posorja y Puerto “El Morro”. La capacidad biorremediadora de metales pesados se evaluará con el equipo de Espectrometría de Emisión Atómica de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-OES) para su cuantificación.

1.6 Objetivo general y específicos

1.6.1 Objetivo general

- Evaluar la capacidad removedora de metales pesados (Cr, Cd, As) empleando taxones de hongos filamentosos aislados de sedimentos marinos del Golfo de Guayaquil, Ecuador.

1.6.2 Objetivos específicos

- Cuantificar las concentraciones de metales pesados presentes en sedimentos marinos de dos sectores puntuales del Golfo de Guayaquil, mediante la técnica de Espectrometría de Emisión Atómica de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-OES).
- Aislar tres taxones de hongos del sitio de muestreo más contaminado con metales pesados e identificar su taxonomía mediante caracterización morfológica y tinción diferencial.
- Establecer tratamientos de remoción de metales pesados (Cr, Cd, As) para evaluar la eficiencia de la biorremediación por parte de los taxones de forma independiente.

1.7 Hipótesis

Ho: No existe disminución de la concentración de metales pesados (Cd, Cr, As) en los tratamientos experimentales con taxones de hongos.

H1: Existe disminución de la concentración de metales pesados (Cd, Cr, As) en los tratamientos experimentales con taxones de hongos.

Capítulo 2

2. Marco teórico

2.1 Golfo de Guayaquil

Es una bahía ubicada en Ecuador, al sur de la provincia del Guayas, entre la península de Santa Elena y el Cabo Blanco en Perú, atravesada por los ríos Guayas y Babahoyo, y está conectada con el océano Pacífico (Avilés, 2022).

Es un área rica en recursos naturales y biodiversidad marina, pero también enfrenta desafíos ambientales, como la contaminación y la degradación del ecosistema; la gestión adecuada y sostenible de esta región es fundamental para mantener su valor ecológico y su importancia económica (Ortega-Pacheco y col., 2020).

Los ecosistemas propios de estas zonas como manglares y bosques secos se ven afectados por la bioacumulación de contaminantes, correspondientes a los restos de materia orgánica e inorgánica producto de actividades mineras, industriales y domésticas que se movilizan a lo largo de ambientes acuáticos (Pernia & Cornejo, 2019).

El exceso de nutrientes y partículas en sedimentos marinos por metales pesados aumenta la turbidez y degradación del agua, esto modifica la ecológica de la zona poniendo en riesgo la vida de especies marinas, razón por la cual el manejo de metodologías de biorremediación de sedimentos contaminados tiene como objetivo la prevención de riesgos a la salud ambiental y humana (Hansen y col., 2022).

2.1.1 Puerto “El Morro”

El Puerto “El Morro” es una reserva marina costera con una extensión de 10.130,16 hectáreas que incluye manglares, esteros y canales naturales; su comunidad tiene como actividad principal la pesca, lo cual permite el sustento económico de pescadores, recolectores de conchas y cangrejos, haciendo que el turismo pase a ser una actividad secundaria que, no obstante, ha mejorado sus ingresos económicos, su estilo de vida y han creado un hábito para generaciones de vivir en armonía con la naturaleza desarrollando una actividad productiva consciente y un estado de desarrollo sostenible (Aguirre Torres, 2019).

2.1.2 Puerto “Posorja”

Posorja es un pueblo localizado a lo largo del perfil costero del Pacífico, en la Provincia del Guayas, conocido por sus playas, industria pesquera e instalaciones portuarias por su conexión con las actividades marítimas y comerciales (Go Raymi, 2022).

Es una de las parroquias rurales que pertenecen al cantón Guayaquil, ocupa una extensión de 73,18 Km² con una población aproximada de 24,136 habitantes y su economía se basa en industrias alimenticias, turismo y como aspecto fundamental la pesca artesanal (Banchón Adum, 2015).

2.2 Metales pesados

Son componentes que cumplen funciones en los organismos para la realización de procesos bioquímicos y fisiológicos en los sistemas bioquímicos de organismos que favorecen el metabolismo, sin embargo, pueden resultar tóxicos para los humanos y los ecosistemas (Ferré Huguet y col., 2007).

Algunos de estos metales tienen su origen en fuentes naturales, tales como la corteza terrestre, mientras que otros se generan de actividades humanas, como la industria, la agricultura, la minería, la ganadería, sobre todo, del tráfico en áreas urbanas que hacen que sean considerados como fuentes de metales pesados (Ferré Huguet y col., 2007).

A pesar de que los científicos aún no han establecido una definición clara para el término “metal pesado”, una se basa en la gravedad, pero no es considerada como una definición útil en base a investigaciones sobre los posibles efectos tóxicos que ciertos metales pueden causar en el medio ambiente y los organismos vivos, por lo que otra de sus definiciones que ha sido adoptada es la de un “conjunto de metales o metaloides vinculados a la contaminación y la posibilidad de ser tóxicos”. (Nordberg y col., 2007; Reyes y col., 2016).

2.2.1 Cadmio

El Cadmio (Cd) se puede encontrar en la corteza terrestre, sus aplicaciones incluyen la fabricación de baterías, pigmentos, recubrimientos y plásticos; dándole paso a industrias de actividad metalmeccánica que generen estos procesos de producción a grandes escalas

proporcionando un alto grado de descargas de este metal que contaminan al medioambiente y generan daños al estar en contacto con individuos (Samacá Ruíz & Mogollón Quintero, 2014).

En humanos la exposición de valores mayores a 15 ppm provoca náusea, vómito, dolor abdominal e incluso diarrea, en el caso de peces, aves y mamíferos genera disminución del crecimiento, anemia e hipertensión; la citotoxicidad de este metal se origina por la afinidad hacia los radicales libres como SH, OH, carboxilo, fosfatil, cisteinil e histidil (Pernia & Cornejo, 2019).

2.2.2 Arsénico

El Arsénico (As) es un componente químico natural que puede ser liberado en el medio ambiente por procesos de biotransformación a través de reacciones reductivas, oxidativas y de metilación con base en actividades antropológicas como la minería, aplicación de pesticidas y producción de energía; los efectos que producen en la salud incluyen problemas de piel, enfermedades cardiovasculares, diabetes, daño hepático, afecciones renales, cáncer de piel, vejiga, pulmón y riñón (Octavio Aguilar & Olmos Palma, 2022).

Según el Reglamento Técnico-Sanitaria para el abastecimiento y control de calidad de las aguas potables de consumo público (Real decreto 1138/1990) (Blanco Hernández y col., 1998), el arsénico es considerado como un componente tóxico y con una valoración permisible de 50ppb.

2.2.3 Cromo

El Cromo (Cr) permite la elaboración de acero inoxidable, aleaciones, pinturas, pigmentos, productos químicos y es usado como sales en las industrias de curtiduría de pieles, provocando cantidades excesivas del metal en el ambiente (Porras, 2010).

Se presenta en dos formas principales: Cr (III) y Cr (VI), este último es soluble en agua y posee mayor toxicidad, su rango permisible es de 0,5 mg/L según Medina & Pozo (2013). Estas características mencionadas le permiten integrarse en la cadena trófica generando efectos en el organismo como problemas respiratorios, alteraciones de material genético, erupciones cutáneas, afecciones en el crecimiento de las plantas y disminución del desarrollo de raíces laterales (Octavio Aguilar & Olmos Palma, 2022).

2.3 Sedimento marino

Los sedimentos marinos son detritos rocosos sedimentados por la erosión de la tierra, se componen de materia orgánica (bacterias, hongos, levaduras, microalgas, etc.) e inorgánica (minerales, sales, etc.), además, representan un ecosistema de vida microbiana aeróbica y anaeróbica clave para investigaciones científicas que buscan potenciar los metabolismos de microorganismos a favor de la salud, el ambiente y la economía (Heubeck y col., 2010; Hoshino y col., 2020).

2.3.1 Límites permisibles de metales pesados en sedimentos marinos

Según la normativa nacional documentada por Ministerio del Ambiente Ecuatoriano (2012) en el Anexo 2 del Libro VI del Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente: Norma de Calidad Ambiental del Recurso Suelo y Criterios de Remediación para Suelos Contaminados y la Norma Canadiense CCME (2003) los límites máximos permisibles de valores de metales pesados en sedimentos marinos son As (5 – 5,9 mg/kg), Cd (0,5 – 0,6 mg/kg) y Cr Total (20 – 37,3 mg/kg).

Gracias a la información recopilada de artículos investigativos realizados por Valle Del Mezquital y col. (2005), Belmonte Serrato y col. (2010) y Tomailla & Iannacone (2018), la comunidad europea establece que los valores permisibles son para Cd de 2 a 6 kg ha⁻¹, As de 0.98-500 mg/L y Cr de 100-1.000 mg/kg, valores mínimos al contrastar con el Reglamento 503 de los Estados Unidos, USEPA (United Environment Protection Agency, 1993).

2.4 Hongos filamentosos

Los hongos son organismos heterotróficos y osmotróficos del reino Fungi, que se caracterizan por tener una pared celular multilaminar compuesta de quitina o quitosano, esta estructura es fundamental para su forma y protección contra cambios osmóticos (Frioni, 2005).

Los hongos filamentosos, micelares o llamados “mohos” se presentan en dos formas principales mostrando su cuerpo en 2 porciones, una reproductiva y otra vegetativa que por lo general no presenta coloración y está compuesta por hifas microscópicas, en el micelio aéreo

o reproductivo (por lo general visible) a menudo las hifas se encuentran divididas por tabiques o septos (Romero y col., 2019).

2.5 Biorremediación

La biorremediación es una técnica que utiliza el metabolismo de microorganismos para eliminar, transformar y reducir la contaminación en el medio ambiente con el objetivo de tratar una amplia gama de contaminantes, incluyendo hidrocarburos, metales pesados, compuestos orgánicos volátiles y contaminantes radiactivos (Martín Moreno y col., 2004; Villaveces Palacios, 2019; Quispe, 2020; Lucio Flores y col., 2021 y Paz Barzola, 2021).

Estas técnicas se pueden aplicar en suelo, agua y aire contaminado por ser alternativas sostenibles, respetuosa con el medio ambiente, más económica y menos invasiva que otras técnicas de remediación convencionales, como la excavación y el transporte de residuos contaminados (Niu y col., 1993).

2.5.1 Hongos biorremediadores

Los hongos filamentosos poseen una capacidad biotransformadora de residuos tóxicos a componentes necesarios para su desarrollo, entre los mecanismos biológicos de supervivencia se destaca la precipitación extracelular, cristalización, biosorción celular, reacciones de oxidación, reducción, metilación y desalquilación (Navarro Moreno y col., 2022).

Estos microorganismos ejecutan la absorción de elementos de alta toxicidad (metales pesados) por medio de los micelios y los solubilizan mediante secreción de ácidos orgánicos, reacciones acidólisis, bioacumulación, quelatos y mecanismos de formación de complejos (Pacsi Achahui & Cañari Díaz, 2022).

En la biorremediación, los hongos filamentosos se utilizan para descomponer los contaminantes en sustancias no tóxicas menos dañinas para el medio ambiente con base en la producción de enzimas, sus propiedades biogeoquímicas y bioacumuladoras, como en el caso de *Penicillium spp* (Oña & Gualoto, 2022).

2.6 Mecanismo de acción de los hongos para la remoción de metales.

En la naturaleza, los organismos vivos se exponen a metales pesados, lo que ha llevado al desarrollo de variantes microbianas capaces de tolerarlos, los hongos y otros microorganismos han desarrollado diversos mecanismos de resistencia para enfrentar estos efectos nocivos (Cervantes y col., 2006).

Estudios realizados por Ochoa y Rodríguez (2017); Muñoz y col. (2019) y Villaveces (2019), demuestran que los hongos de género *Aspergillus* y *Penicillium* han brindado resultados exitosos en estudios realizados *ex situ* a cerca de la remediación fúngica de contaminantes como el Pb, Ni, Au, Cr, Ag, Cu, Zn, Cd, Co, F y As.

Los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* son considerados como los principales hongos filamentosos para la remoción de metales a través de un mecanismo de transformación que corresponde a la inmovilización del metal haciendo que este pase de un estado acuoso a uno sólido (Vullo, 2003).

La inmovilización del metal por parte de los hongos antes mencionados se da por mecanismo de biosorción, proceso en donde la biomasa fúngica absorbe metales en sus tejidos por acción de las paredes celulares y enzimas extracelulares del hongo que pueden unirse a iones metálicos concentrándolos dentro de las células fúngicas (Cañizares, 2000).

Por otra parte, *Aspergillus niger* es una especie que no realiza biosorción del contaminante, sino que emplea un mecanismo de bioacumulación, proceso celular que implica un transporte del contaminante mediante la internalización de iones metálicos dispuestos en el entorno hacia la membrana del microorganismo, cuando el metal se incorpora al citoplasma se compartimentaliza dentro de la vacuola (Beltrán y Gómez, 2016).

2.6 Determinación de metales pesados mediante la tecnología ICP-OES

ICP-OES es una técnica de análisis que permite identificar y cuantificar múltiples elementos de la tabla periódica, excepto C, N, O, H, F, gases nobles y algunos elementos terrestres raros o pocos frecuentes (Instituto de Catálisis y Petroquímica, 2019).

En esta técnica, se introducen muestras líquidas continuas donde un sistema de nebulización crea un aerosol que se suministra mediante gas argón a un soplete de plasma

acoplado a inducción de radiofrecuencia; debido a la alta temperatura del plasma los analitos se atomizan e ionizan creando un espectro de emisión atómica que se difunden mediante una rejilla de difracción y un detector fotosensible, esta información es procesada por sistemas informáticos (Ribón Lozano & Naharro Ferrero, 2019).

La técnica mencionada en comparación de la ICP-MS (Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente), tiene la capacidad de analizar muestras con mayores concentraciones del analito generando mejores respuestas (Vanina y col., 2019). El ICP-MS detecta los elementos metálicos con un límite de detección inferior a 10 partes por trillón (ppt), mientras que el límite de detección para ICP-OES es superior a 10 partes por billón (ppb) (Fisher Scientific Inc, 2016).

Capítulo 3

3. Materiales y métodos

3.1 Diseño experimental

El modelo de investigación corresponde a un paradigma cuantitativo para evaluar hipótesis, medir y comparar resultados mediante un grupo experimental y de control enfocándose en la diferencia de concentración de metales pesados antes y después del tratamiento.

3.2 Población y muestra

La población muestral de la investigación se delimitó a sedimentos marinos contaminados por metales pesados que puedan tener contacto con residuos de camaroneras, industrias alimenticias, zona de desembarcaciones y áreas turísticas en el Golfo de Guayaquil.

Las muestras se obtuvieron mediante muestreo aleatorio sistemático de los sedimentos marinos provenientes de Puerto Posorja y Puerto “El Morro” en base a un primer punto elegido de forma aleatoria y los demás elementos utilizando un intervalo de separación en forma de zigzag de 10 metros.

3.3 Variables

3.3.1 *Variable dependiente*

La variable dependiente del estudio fue el grado de metales pesados.

3.3.2 *Variable independiente*

Corresponde a los taxones de hongo filamentosos con actividad para la remoción de metales pesados.

3.4 Técnicas de procesamiento, recolección y análisis de datos

3.4.1 Procesamiento y recolección de datos

Se utilizaron programas de análisis y almacenamiento como base de datos de Excel, IBM-SPSS y Qtegra Software.

3.4.2 Procesamiento y análisis de datos

Se emplearon medidas de tendencia central para representar los promedios de cada parámetro evaluado y un test paramétrico de estadística (Prueba T-Student) para la información recopilada sobre los niveles de metales presentes en las muestras analizadas antes y después del tratamiento.

3.5 Procedimientos

3.5.1 Recolección de muestras de sedimento marino

Como establece Taft & Jones (2001), se delimitó los puntos de muestreo de sedimento marino en el Golfo de Guayaquil a Puerto Posorja y Puerto “El Morro” en función de las características industriales (camaroneras, pesca artesanal y terminal de contenedores), turísticas (ecosistemas marino-costeros y manglares protegidos) y domésticas de las zonas.

La colecta de las muestras se basó en protocolos establecidos por Taft & Jones (2001) en Ohio EPA Sediment Sampling Guide and Methodologies, y en la Guía de orientación sobre el muestreo de sedimentos del fondo de ríos, lagos y zonas estuarinas, ISO 5667-12 (2017), en donde se recolectó 4 muestras de sedimento marino de cada área de estudio para obtener un total de 8 muestras finales.

Se escogió al azar el primer punto de análisis a una distancia de 20 metros de la orilla del manglar y los demás puntos de muestreo continuaron en forma de zigzag con una distancia de 10 metros entre ellos (Casal & Mateu, 2003).

Para cada muestra se realizaron 3 submuestras de sedimento marino, se mezcló y recogió 350 g finales que se rotularon y conservaron en hieleras a 4°C (ISO 5667-12, 2017).

La toma de data se realizó con una pala de mango anilla y georreferenciaron las coordenadas de muestreo con un equipo GPS de campo GARMIN - ETREX10 (Taft & Jones, 2001).

3.5.2 Análisis físicoquímico de las muestras

El registro de información de los parámetros físicoquímicos se realizó con base en los manuales de uso de cada equipo:

- **Potencial de hidrógeno (pH)**

Se realizó una lectura por triplicado en el equipo METTLER TOLEDO SevenCompact pH meter S220 de una suspensión de relación 20:200 sedimento/agua para cada punto de muestreo (20 g de muestra y 200 ml de agua tipo 1).

- **Conductividad**

La lectura de conductividad de las muestras se registró por triplicado con el equipo OAKTON PCTSTestr 50™ a partir de suspensiones 20:200 sedimento/agua.

- **Humedad**

El analizador de humedad empleado OHAUS – MB23 tiene una capacidad de 110 g de muestra con lectura mínima de 0,01 g/0,1%. Se colocó una alícuota de 2 g de cada muestra de sedimento marino en platillos de aluminio dentro del equipo analizador de humedad a una temperatura de 150°C y rango de tiempo entre 24 y 35 minutos.

3.5.3 Preparación de muestras de sedimento marino para digestión ácida

La preparación de las muestras incluyó secado, molienda y tamizaje mediante adaptación del Instructivo de Preparación de Suelos y Sedimentos para Análisis descrito por (Giralda, 2020).

- **Secado**

Se armó 8 recipientes de aluminio en forma de bandejas que fueron colocados en charolas rotuladas con los datos de cada zona de muestreo, se colocó el sedimento marino en cada bandeja y se llevó a la estufa Memmert UUSS a 110°C por 3 días.

- **Molienda**

Las muestras de sedimento seco se trituraron y molieron en morteros de porcelana para la eliminación de material grueso (rocas, basura, plantas, etc.).

- **Tamizaje**

Para asegurar la ausencia de material innecesario las muestras se tamizaron con ayuda de un tamiz Pinzuar Granotest ASTM-11 de 75 µm de apertura con agitación manual, se guardaron en fundas ziplock rotuladas y se conservaron a temperatura ambiente.

3.5.4 Digestión ácida por microondas bajo la norma EPA 3051

Para la digestión ácida se pesó 0,5 g de cada muestra tamizada en la balanza analítica Sartorius ENTRIS224-1S, la cantidad se colocó en vasos de digestión y se adicionó 9 ml de ácido nítrico concentrado libre de metales más 3 ml de ácido clorhídrico concentrado (EPA 3051, 2018), esta actividad se realizó en una cabina de flujo laminar BIOBASE – BBSH1800.

Se sellaron los vasos digestores con las muestras y con el blanco, los mismos que se posicionaron en el tambor del equipo digestor CEM MARS 6, de inmediato se programó el equipo bajo la normativa EPA 3051 colocando condiciones de reacción específicas como temperatura de 175°C durante una rampa de tiempo de 5 minutos y 30 segundos a una presión de 800 psi con potencia entre 900 - 1800 W y mantenerse a 175°C durante 4 minutos y 30 segundos sin movimiento, como se encuentra descrito en la Tabla 1.

Tabla 1. *Parámetros de reacción para la digestión ácida de sedimento marino bajo normativa EPA 3051 en digestor CEM MARS 6.*

Etapa	Temp (°C)	Ramp (mm:ss)	Mantener (mm:ss)	Presión (psi)	Potencia (W)	Movimiento
1	175	5:30	4:30	800	900 - 1800	Apagado

Fuente: CEM MARS 6 Method Note Compendium (2018), traducido por Bustamante y Romero, (2023).

Al finalizar el proceso se dejó enfriar los vasos digestores en la cabina de flujo laminar, luego se procedió a filtrar al vacío las muestras con la bomba Gast DOA-P704-AA y se realizó el aforado en matraces de 50 ml con ácido nítrico libre de metales al 2%, para finalizar las muestras se conservaron en envases PET de 60 ml a una temperatura de 4°C hasta el día del análisis (EPA 3051, 2018).

3.5.5 Determinación de metales pesados mediante la tecnología ICP-OES

El proceso de determinación de metales pesados inició con el acondicionamiento del equipo ICP-OES Thermo Fisher iCAP 7000 Plus, se prepararon las disoluciones con estándares correspondientes a trazas de metales (As, Cd, Cr) que conforman la recta de calibrado y se registraron secuencias que indicaban la posiciones en que debían ser colocadas las muestras en el automuestreador para la detección de la cantidad de metal en las muestras, los resultados fueron reflejados de forma automática a través del software Qtegra (Thermo Fisher, 2018).

3.5.6 Aislamiento y aclimatación de microorganismos biorremediadores de metales pesados

Para el aislamiento de los taxones de hongos a partir de sedimento marino del Golfo de Guayaquil se realizaron los siguientes procesos dentro de un periodo de 24 horas después de la recolección de estas.

- **Preparación de inóculo y siembra**

Basado en una modificación de Cárdenas y col. (2015), se sembró una alícuota de 1 ml de suspensión de una muestra madre preparada de cada punto de muestreo (100 g de sedimento

marino disueltos en 900 ml de agua estéril), estas siembras se realizaron en condiciones escépticas por duplicado en medios de cultivo SDA + Cloranfenicol suplementados de forma individual con los metales pesados en estudio a concentraciones de 0,5 ppm, por último las cajas sembradas se incubaron a 24°C durante 7 días en la incubadora Elos Breed B055N.

3.5.7 Resiembra y purificación de colonias de hongos biorremediadores

Mediante una adaptación de la metodología de García (2004) para la resiembra y purificación de taxones de hongos, se midió el diámetro del halo de crecimiento de cada taxón aislado utilizando el Calibrador de Vernier a los 7 días de incubación, y se sembraron en medio PDA suplementado a concentración determinada de metales, solo aquellos con las medidas de diámetro más representativas (como se muestra en la tabla 2), de esta manera, se delimitaron 5 taxones de hongos para Cr y Cd y un total de 6 taxones para As, los mismos que se incubaron a 24°C durante 7 días.

Tabla 2. Medios de cultivo PDA suplementado con metales pesados en concentraciones mínimas y máximas.

Metal	PDA + Concentración mínima (ppm) según resultados ICP-OES	PDA + Concentración máxima (ppm) según revisión bibliográfica	Referencia
Cr	43	50	(Alcívar Tenorio y col., 2011; Jiménez Verdesoto, 2012; Guarco, 2015)
Cd	2	10	(Mero y col., 2012; Proaño Alvarado, 2016; Pernía Santos y col., 2018)
As	3	8	(Paz Barzola, 2021)

Fuente: Bustamante y Romero, (2023).

- **Resiembra sucesiva para selección definitiva de tres taxones de hongos con potencial biorremediador**

Se seleccionó 1 taxón por cada metal correspondiente a los medios de cultivo con concentración máxima de contaminante con base en sus características macroscópicas de adaptación, fueron sembrados por duplicado en medios de cultivo PDA sin presencia de metales pesados e incubados a 24°C por 7 días (Cárdenas y col., 2015).

3.5.8 Identificación de taxones de hongos biorremediadores

Para la identificación taxonómica de los hongos se observaron las características macroscópicas (color, tamaño, forma de las colonias) y microscópicas (esporas, conidióforos, fiálides, conidios) en el microscopio AMSCOPE B520A.

Según Prats (2007), se implementó la técnica de impresión de esporas en cinta adhesiva para la visualización de estructuras microscópicas en 40x y 100X, la metodología consiste en tocar de forma sutil la colonia del hongo con la cinta adhesiva y plasmarla en un portaobjeto con una gota de azul de lactofenol.

La identificación se realizó mediante revisión bibliográfica de “Illustrated Genera of Imperfect Fungi” (Barnet & Barry, 1998), “Microbiología Clínica” (Prats, 2007) y “Larone’s Medically Important Fungi: A Guide to Identification” 6th edition (Walsh y col., 2018).

3.5.9 Tratamiento a escala de laboratorio de biorremediación de metales pesados con hongos filamentosos aislados

Se realizó un tratamiento experimental en medio de cultivo líquido SDB modificado (26 g dextrosa + 13 g de peptona a un pH 5,6) para observar la remoción de metales pesados por parte de los taxones de hongos aislados en concentración máxima de contaminante (Narrea Cango & Malpartida Zevallos, 2006).

Se establecieron 8 tratamientos experimentales con su respectivo grupo de control en matraces Erlenmeyer de 250 ml, a los cuales se les agregaron los contaminantes y hongos biorremediadores por individual y un mix.

- **Conteo de esporas.**

Se preparó una solución de Tween 80 al 1% (1 ml de Tween 80 + 9 ml de agua destilada) en 3 tubos de ensayo, los cuales fueron inoculados con 3 taxones de hongos de forma individual y se llevaron a Cámara de Neubauer para el conteo de esporas (Cañedo & Ames, 2004).

El conteo de esporas de cada taxón se determinó mediante Cámara de Neubauer en el cuadrante central (25 cuadros) considerando solo los cuadros menores de las esquinas y el central, la concentración de esporas se obtuvo en función de la siguiente fórmula (Hernández, 2022).

$$C = \left[\left(\frac{N}{4} \right) * FD \right]$$

En donde:

C = concentración cel/ml

N = número de células contadas

FD = factor de dilución

- **Inoculación de hongos filamentosos en el medio de cultivo líquido**

Basado en una modificación de la metodología de Villalba Villalba & Gómez Azuara (2019) se inoculó 1 ml de la suspensión de esporas de cada taxón en los medios de cultivo del tratamiento experimental y se llevó a incubación en el equipo Heidolph Plug & Play Agitador de plataforma Unimax1010 a 25°C y 200 rpm por 20 días.

3.5.10 Digestión abierta

La digestión se realizó mediante un método indirecto de concentración de metales basado en la investigación realiza por Hidalgo & Osorio (2013), para ello se colocó 1 ml del medio de cultivo del tratamiento en un vaso de precipitación de 50 ml, luego se agregó 10 ml de ácido nítrico y 2 ml de peróxido de hidrógeno para digerir y mineralizar los compuestos durante 30 minutos de reposo en la cabina de flujo laminar, para finalizar se aforó a 50 ml y se conservó en refrigeración (4 - 8°C).

3.5.11 Análisis ICP-OES del tratamiento experimental de biorremediación

Se realizó por segunda vez el procedimiento detallado en el apartado 5.5 del capítulo 3, donde se detalla el análisis de la técnica mencionada, este proceso se llevó a cabo para cuantificar las concentraciones de los metales estudiados en las muestras obtenidas a partir de cada cultivo del tratamiento experimental.

Capítulo 4

4. Resultados y discusión

4.1 Ubicación de puntos de muestreo

Los detalles de los puntos de muestreo del Golfo de Guayaquil se georreferenciaron con coordenadas en unidades UTM (meridiano).

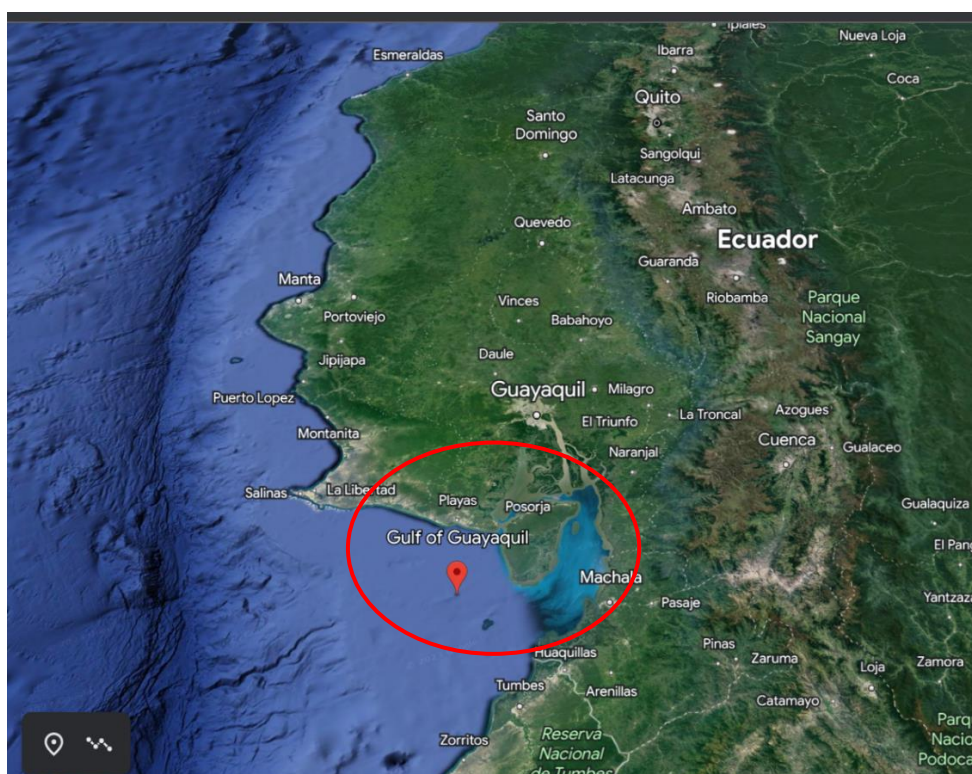


Figura 1. Delimitación geográfica de la zona de estudio (Golfo de Guayaquil).

Fuente: Google Earth, elaborado por Emily Bustamante y Kathia Romero.

Tabla 3. Ubicación de áreas de muestreo.

Lugar	Ubicación	Coordenadas
Puerto Posorja	Provincia Guayas Cantón Guayaquil	2°43'0" S y 80°16'60" O
Puerto "El Morro"	Provincia Guayas Cantón Guayaquil	2°36'0" S y 80°16'60" O

Fuente: Bustamante y Romero, (2023).

4.1.1 Detalles de coordenadas de muestreo en Puerto Posorja



Figura 2. Delimitación geográfica del Puerto Posorja (Golfo de Guayaquil).

Fuente: Google Earth, elaborado por Bustamante y Romero, (2023).



Figura 3. Delimitación geográfica de los puntos de muestreo en el Puerto Posorja (Golfo de Guayaquil).

Fuente: Google Earth, elaborado por Bustamante y Romero, (2023).

Tabla 4. *Coordenadas geográficas de los puntos de muestreo en Puerto Posorja.*

Punto de muestreo	Coordenadas UTM
Punto 1	17 M 0606233 9757459
Punto 2	17 M 0583187 9703049
Punto 3	17 M 0583254 9703319
Punto 4	17 M 0596472 9736407

Fuente: Bustamante y Romero, (2023).

Los puntos de muestreo utilizados en la investigación fueron seleccionados con ayuda del Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial Parroquia Rural Posorja (2015); la zona de Puerto Posorja seleccionada presenta mayor grado de contaminación por falta de servicio de recolección de basura y por los canales generados a causa de las descargas de industrias atuneras que se encuentran situadas alrededor del puerto (Banchón y col., 2015)

Estas industrias generan contaminación debido a que emplean buques de embarcaciones que atracan el puerto descargando cantidades de toneladas de atunes para que sean procesados previos a su exportación, y liberando cantidades sustanciales de metales como Cu, Zn, Cr, As, etc., que luego se acumulan en el sedimento marino (Suarez, 2017).

Además, realizan diferentes tipos de pruebas para las conservas de atún implementando equipos y maquinarias que generan derrames de combustible, los cuales contienen componentes tóxicos como Sb, As, Be, Cd, Cr, Co, etc.; al igual que los productos químicos corrosivos empleados para realizar procesos de desinfección o limpieza en el interior de los equipos utilizados para la producción de ceras, abrillantadores, imprimaciones, etc. que generan grandes cantidades de contaminantes y comprometen el equilibrio del ecosistema del puerto (Calabuig, 2017).

4.1.2 Detalles de coordenadas de muestreo en Puerto “El Morro”



Figura 4. Delimitación geográfica del Puerto “El Morro” (Golfo de Guayaquil).

Fuente: Google Earth, elaborado por Bustamante y Romero, (2023).

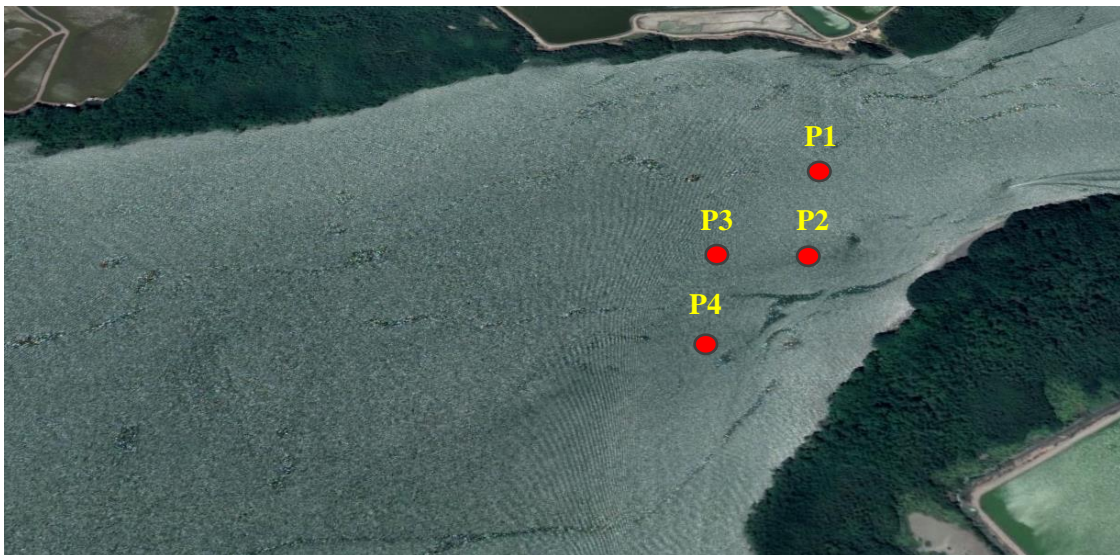


Figura 5. Delimitación geográfica de los puntos de muestreo en el Puerto “El Morro” (Golfo de Guayaquil).

Fuente: Google Earth, 2023 elaborado por Bustamante y Romero, (2023).

Tabla 5. *Coordenadas geográficas de los puntos de muestreo de Puerto “El Morro”.*

Punto de muestreo	Coordenadas UTM
Punto 1	17 M 577434 9711452
Punto 2	17 M 582900 9707755
Punto 3	17 M 577332 9718916
Punto 4	17 M 623146 9757089

Fuente: Bustamante y Romero, (2023).

Los puntos de muestreo del área mencionada se escogieron con base a una recabación bibliográfica de documentos científicos que evidencian la presencia de contaminantes tóxicos en el sedimento.

Al igual que en la primera zona de muestreo de Puerto Posorja, el Puerto “El Morro” se encuentra rodeado por empresas camaroneras que descargan sus desechos día a día al realizar sus procesos de producción y limpieza, lo que permite que exista mayor contaminación a comparación de otras zonas costeras como playas, ríos o lagos, perjudicando a los seres vivos nativos de la zona (Durán Albuja, 2022).

Entre las principales actividades generadoras de componentes químicos y tóxicos que aumentan las concentraciones de metales en agua y sedimento se pueden mencionar la recolección de conchas y el turismo asociado al mantenimiento de las embarcaciones (Molina Álava y col., 2018).

En la actividad de muestreo se pudo corroborar la incidencia de contaminación por aguas servidas sin previos tratamientos por parte de lugares turísticos como restaurantes, hoteles, bares y viviendas aledañas de la zona que vierten sus efluentes de forma directa en el puerto.

4.2 Cuantificación de metales pesados en sedimento marinos del Golfo de Guayaquil

En la tabla 6 se muestran los valores correspondientes a la medición por ICP-OES de las concentraciones de metales pesados (Cd, Cr y As) presentes en las muestras de sedimento marino recolectadas de Puerto de Posorja y Puerto “El Morro”. Estos datos son representados en la figura 6 y 7 que evidencian el comportamiento de los metales en las zonas de muestreo.

Tabla 6. Concentraciones de Cd, Cr y As en muestras de sedimento marino del Golfo de Guayaquil.

Muestras	Promedio de las concentraciones de los metales (PPM)		
	Cd	Cr	As
Puerto Posorja Punto 1.1 y 1.2	1,5	37	2,65
Puerto Posorja Punto 2.1 y 2.2	2	45,5	3,75
Puerto Posorja Punto 3.1 y 3.2	1,55	36,3	2,1
Puerto Posorja Punto 4.1 y 4.2	1,1	25,4	0,8
Puerto “El Morro” Punto 1.1 y 1.2	1,95	47,05	3,15
Puerto “El Morro” Punto 2.1 y 2.2	2,05	50,3	2,9
Puerto “El Morro” Punto 3.1 y 3.2	2,05	49,15	3,2
Puerto “El Morro” Punto 4.1 y 4.2	1,8	43,15	3,75

Fuente: Bustamante y Romero, (2023).

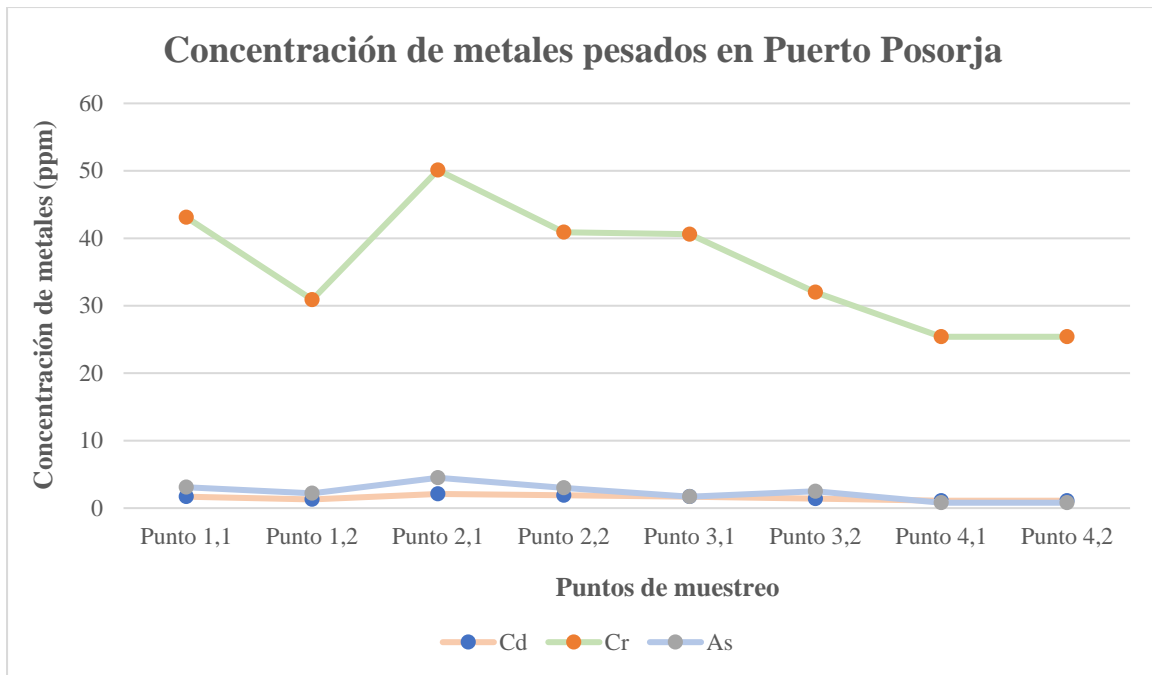


Figura 6. Gráfica de concentración de metales pesados en sedimento marino de Puerto Posorja.

Fuente: Bustamante y Romero, (2023).

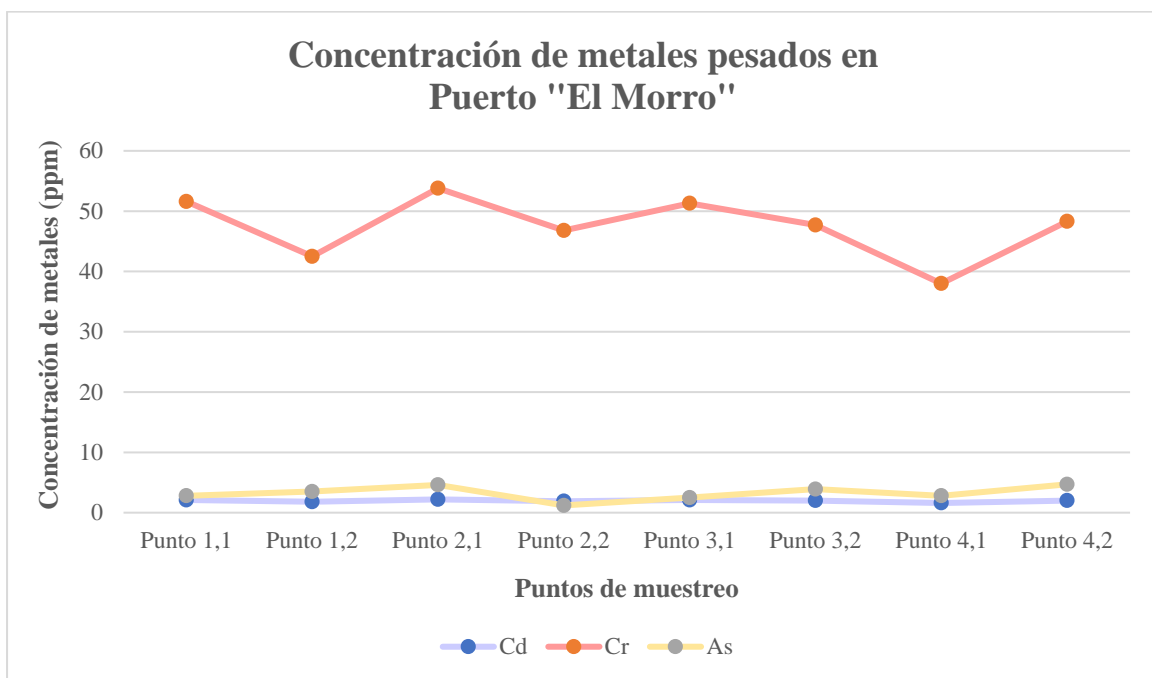


Figura 7. Gráfica de concentración de metales pesados en sedimento marino de Puerto "El Morro".

Fuente: Bustamante y Romero, (2023).

Los datos obtenidos en Puerto Posorja evidencian un rango de concentración de Cd entre 1,1 – 2,1 ppm, en el caso de Cr los límites son 25,4 – 50,1 ppm, por otro lado, As presenta un mínimo de 0,8 ppm y un máximo de 4,5 ppm. No obstante, Puerto “El Morro” exhibe límites mínimos y máximos de concentración de metales como 1,6 – 2,2 ppm para Cd, 38,0 – 53,8 ppm para Cr y 1,2 – 4,7 ppm para As.

La cuantificación de concentración de metales pesados en Puerto Posorja y Puerto “El Morro” reflejan valores superiores a los límites permitidos por la normativa Nacional y la normativa Canadiense como es el caso de Cr y Cd que presentan un promedio de 41,8 y 1,8 ppm de forma respectiva en contraste con los rangos permisibles de 20 – 37,3 mg/kg (Cr) y 0,5 – 0,6 mg/kg (Cd), caso contrario de As que presenta un promedio de 3 ppm situado dentro de los parámetros permisible de concentración (rango permisible de 5 – 5,9 mg/kg) (CCME, 2003; Ministerio del Ambiente, 2012).

Realizando una comparativa entre estudios similares del análisis de metales pesados en sedimento marino del Golfo de Guayaquil se tienen datos de 9,5 ppm Cd y 43,47 ppm Cr en el Estero Salado (Alcívar Tenorio y col., 2011); 6,92 ppm Cd en Puerto “El Morro” (Mero y col., 2012); 0,106 mg/kg Cd en manglar y 2,34 mg/kg Cd cercano a puente sin presencia de vegetación en el Estero Salado (Pernía Santos y col., 2018b) y 4,09 mg/kg As y 52,3 mg/kg Cr en el Estero Santa Ana (Paz Barzola, 2021), que permiten verificar la presencia de contaminación superior a los límites establecidos de seguridad ambiental en estas zonas.

El punto de muestreo con mayor contaminación en Puerto Posorja fue el Punto 2 con un promedio de 2 ppm Cd, 45,5 ppm Cr y 3,75 ppm As, de igual forma, el Punto 2 de muestreo en Puerto “El Morro” reflejó los valores más altos de metales pesados con un promedio de 2,05 ppm Cd, 50,3 ppm Cr y 4,6 ppm As.

La diferencia entre los niveles de contaminación de ambas localidades se ve influenciada tanto por los vertidos de aguas residuales domésticas e industriales que no son sometidos a tratamientos previo a su emisión (Carballo Hondal y col., 2003), como la contaminación por desembarque de vehículos marítimos que realizan limpieza y cambio de combustible en las orillas del Golfo (Rodríguez Moreira, 2006), además de los parámetros fisicoquímicos del sedimento marino como la conductividad, que a su vez está relacionada con el porcentaje de salinidad, debido a que valores bajos indican la presencia de iones libres que

se puedan acumular (López Jiménez y col., 2012) y el tipo de suelo arcilloso con mayor potencial de disponibilidad y acumulación de iones metálicos (Herrera Núñez y col., 2013).

4.3 Parámetros fisicoquímicos del sedimento marino del Golfo de Guayaquil

Los parámetros fisicoquímicos permiten caracterizar la calidad de los sedimentos marinos en función a la contaminación del sitio, considerando propiedades como humedad, pH y conductividad que se reportan en las tablas 7, 8 y 9 junto a gráficas que describen el comportamiento de los parámetros en las zonas (detalle en las figuras 8, 9 y 10).

4.3.1 Humedad

Tabla 7. Valores de humedad de las muestras de sedimento marino de Puerto Posorja y Puerto “El Morro”.

Muestra	Humedad (%)
Posorja P1	63,2
Posorja P2	62,7
Posorja P3	54,3
Posorja P4	63,2
Morro P1	64,6
Morro P2	63,8
Morro P3	63,7
Morro P4	55,7

Fuente: Bustamante y Romero, (2023).

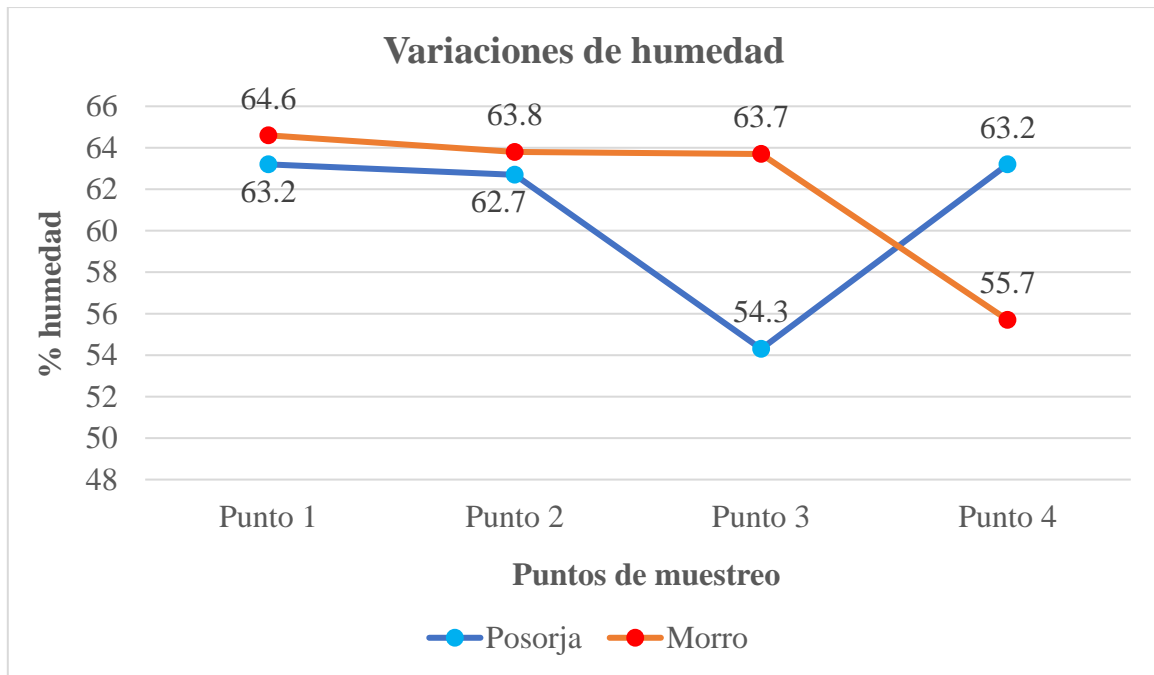


Figura 8. Gráfica de variaciones de humedad en los puntos de muestreo de Puerto Posorja y Puerto “El Morro”.

Fuente: Bustamante y Romero, (2023).

El porcentaje de humedad generado para los 4 puntos de muestreo realizados en Puerto Posorja obtuvieron un rango entre 54,3% (porcentaje mínimo) y 63,2% (porcentaje máximo), lo que indica que las muestras presentaban un alto porcentaje de humedad. Por otro lado, en Puerto “El Morro” se consiguieron valores de humedad muy similares a los del Puerto Posorja con datos que oscilaban entre 63,2 % (porcentaje mínimo) y 64,6 % (porcentaje máximo).

Los datos mencionados entre ambos puertos generan un promedio del 61,4% de humedad. El estudio realizado por Medina y col., (1999) menciona que la humedad es un factor crítico para el crecimiento de hongos ya que afecta de forma directa a su desarrollo requiriendo de un alto porcentaje de este parámetro para prosperar debido a que dependen de ella para absorber nutrientes y mantener su estructura celular.

Cuando la humedad es adecuada, los hongos pueden crecer y reproducirse de manera efectiva, pero si la humedad es insuficiente, los hongos pueden deshidratarse y detener su crecimiento (National Center for Environmental Health, 2020). Por otro lado, al ser la humedad excesiva, puede haber competencia con otros microorganismos, como bacterias, que también pueden proliferar en ambientes húmedos (Morales Santos, 2019).

La relación entre la humedad y los metales pesados para el crecimiento de hongos en el agua es importante ya que influye en la capacidad de absorción y acumulación de estos por parte de los microorganismos mencionados (Ortiz Catón y col., 2011).

Así se establece que un ambiente con niveles adecuados de humedad es necesario para que los hongos puedan llevar a cabo sus procesos metabólicos y de absorción de metales, sin embargo, si la humedad es insuficiente, su capacidad de absorción puede verse comprometida (Ramos Vásquez y Dávila, 2008).

4.3.2 pH

Tabla 8. Datos de pH de las muestras de sedimento marino de Puerto Posorja y Puerto “El Morro”.

Muestra	Promedio de pH
Posorja P1	7,04
Posorja P2	6,98
Posorja P3	7,23
Posorja P4	7,09
Morro P1	7,63
Morro P2	7,54
Morro P3	7,21
Morro P4	7,63

Fuente: Bustamante y Romero, (2023).

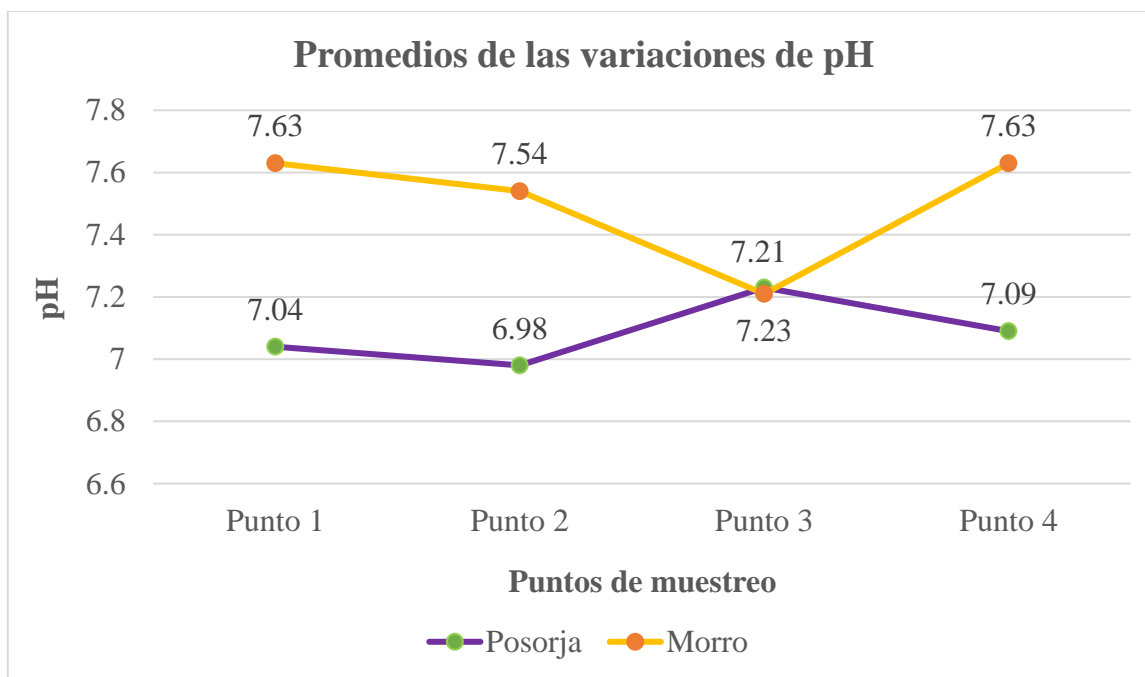


Figura 9. Gráfica de comportamiento de los valores de pH en los puntos de muestreo de Puerto Posorja y Puerto “El Morro”.

Fuente: Bustamante y Romero, (2023).

Los análisis de pH en las muestras analizadas mantienen valores entre 6,98 y 7,63 obtenidos a partir de 3 réplicas del análisis del parámetro. En la figura 9 se analiza la comparación de los datos, observando que los valores de pH de los puntos de muestreo de Puerto “El Morro” no difieren en gran medida con los resultados de Puerto Posorja.

Los niveles de pH en el sedimento marino pueden variar dependiendo de la ubicación geográfica, la influencia de fuentes de contaminación y otros factores locales. Sin embargo, en condiciones marinas típicas, el pH del sedimento marino tiende a estar en el rango cercano a la neutralidad, que es un pH de alrededor de 7.5 a 8.5, valores que contrastan con los obtenidos en este estudio (pH 6,98 a 7,6) (Ortiz García y col., 2020).

Los resultados de pH presentaron rangos de valores neutros comprobando lo descrito en la investigación realizada por Fuenmayor y col., (2009) que indican que, en las condiciones marinas típicas, el pH del sedimento tiende a estar en el rango cercano a la neutralidad, que es un pH de alrededor de 7.5 a 8.5.

Es importante destacar que los sedimentos marinos pueden experimentar cambios en el pH debido a procesos naturales y actividades humanas. Esto puede ocurrir por la generación

de ácidos orgánicos al momento de la descomposición de materia orgánica en el sedimento, lo que puede disminuir de manera temporal el pH en la zona. Además, la contaminación con productos químicos, como los vertidos de aguas residuales o la escorrentía de fertilizantes, puede alterar los niveles de pH en el sedimento marino y tener efectos negativos en sus ecosistemas (Aguirre y col., 2009).

Se puede considerar que, en las condiciones de pH ácido o neutro, algunos metales pesados como el Pb, Cd y el Al pueden volverse más solubles y, por lo tanto, estar más disponibles para la absorción por organismos marinos.

4.3.3 Conductividad

Tabla 9. Datos de conductividad de las muestras de sedimento marino por triplicado en Puerto Posorja y Puerto “El Morro”.

Muestra	Promedio de conductividad (mS/cm)
Posorja P1	10,94
Posorja P2	8,85
Posorja P3	6,83
Posorja P4	9,15
Morro P1	4,17
Morro P2	5,24
Morro P3	8,54
Morro P4	4,67

Fuente: Bustamante y Romero, (2023).

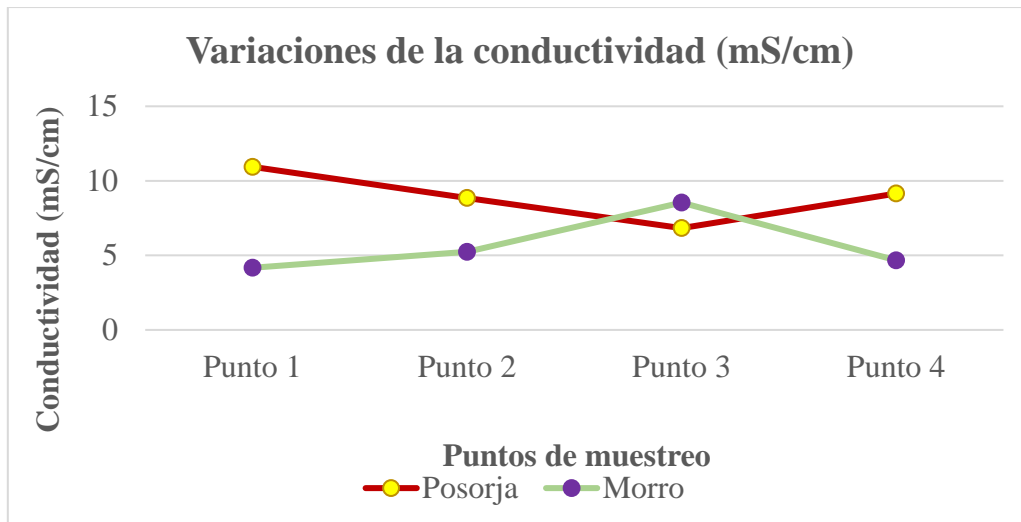


Figura 10. Gráfica de variaciones de conductividad en los puntos de muestreo de Puerto Posorja y Puerto “El Morro”.

Fuente: Bustamante y Romero, (2023).

La conductividad presentó valores bajos en las réplicas del Puerto “El Morro” con valores entre 4,16 y 8,60 a comparación de los de Puerto Posorja que incidían en valores entre 6,79 y 10,98 (en la figura 10 se analiza la comparación de los datos de conductividad).

Cuando hay contaminación por metales pesados, como Pb, Hg, Cd u otros, en agua o sedimentos, estos metales pueden disolverse y contribuir a un aumento en la conductividad; esto se debe a que los iones metálicos liberados en el agua pueden aumentar la concentración de iones en solución, lo que, a su vez, aumenta la capacidad del agua para conducir la electricidad (Pérez Martínez y Romero, 2015).

Una mayor conductividad a menudo indica una mayor concentración de sales y minerales disueltos, lo que puede proporcionar a los hongos una fuente de nutrientes; efecto en el crecimiento ya que algunos toleran ciertos niveles de salinidad y conductividad, mientras que otros pueden ser sensibles a altas concentraciones de sales (Ceiro y col., 2014).

Una investigación desarrollada por Kravetz y col., (2023) enfatiza que la conductividad excesiva debido a la contaminación puede ser perjudicial para los hongos y limitar su crecimiento, también puede influir en la composición de la comunidad microbiana en un entorno acuático o sedimentario. Los hongos interactúan con otros microorganismos, y la salinidad puede afectar la estructura de estas comunidades.

En el marco de la biorremediación, se observa una conexión entre la conductividad, los metales pesados y los hongos en el agua y los sedimentos. Algunos hongos poseen la habilidad de capturar y acumular componentes tóxicos, permitiendo que el parámetro de conductividad pueda influir en cómo estos metales se desplazan y se vuelven accesibles para los hongos (Muñoz Silva y col., 2019).

En resumen, las condiciones como pH moderado (6,0 a 7,0) y conductividad moderada o baja (4,7 a 10,9) evidencian un aumento de la distribución microbiológica ante la fácil adaptabilidad de los microorganismos en comparación a niveles de pH más ácidos y conductividad más alta que reducen el desarrollo de bacterias, mohos y levaduras (Romero y col., 2008).

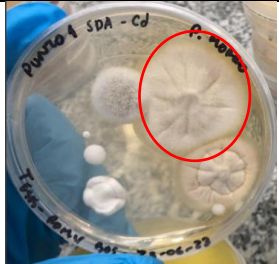
4.4 Aislamiento e identificación de taxones de hongos biorremovedores de metales pesados

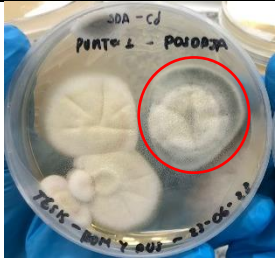


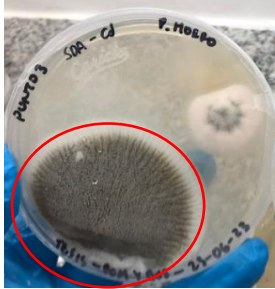


4.4.1 Medición del halo de crecimiento de hongos






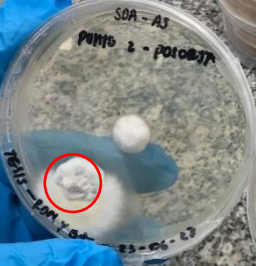
Los taxones de hongo aislados de las muestras de sedimento marino de Puerto Posorja y Puerto “El Morro” fueron enumerados y clasificados por su medición del diámetro del halo de crecimiento como se adjunta en Anexo 2 y 3.



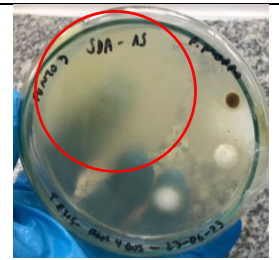
A continuación, en la Tabla 10 se detallan 16 taxones seleccionados para la resiembra en PDA suplementado con concentración mínima y máxima de Cr, Cd y As basado en las características de adaptabilidad y condiciones fisicoquímicas de los hongos.

Tabla 10. Taxones seleccionados para resiembra de metales pesados.

Metal	Taxón	Diámetro del halo de crecimiento (mm)	Punto de muestra	Figura
Cd	1	37,20	Puerto “El Morro” Punto 1.1 Código (PM P1.1)	

	6	48,17	Puerto Posorja Punto 1.1 Código (PP P1.1)	
	1	33,76	Puerto Posorja Punto 3.2 Código (PP P3.2)	
	1	39,46	Puerto "El Morro" Punto 3.2 Código (PM P3.2)	
	1	48,67	Puerto "El Morro" Punto 3.1 Código (PM P3.1)	
Cr	1	29,31	Puerto "El Morro" Punto 3.1 Código (PM P3.1)	
	1	34,64	Puerto "El Morro" Punto 4.2 Código (PM P4.2)	

	1	85,09	Puerto "El Morro" Punto 1.1 Código (PM P1.1)	
	1	35,17	Puerto "El Morro" Punto 3.2 Código (PM P3.2)	
	2	15,95	Puerto "El Morro" Punto 2.1 Código (PM P2.1)	
As	2	33,32	Puerto "El Morro" Punto 4.2 Código (PM P4.2)	
	1	30,72	Puerto "El Morro" Punto 1.1 Código (PM P1.1)	
	2	26,47	Puerto Posorja Punto 2.1 Código (PP P2.1)	

	1	49,14	Puerto Posorja Punto 4.2 Código (PP P4.2)	
	1	49,30	Puerto Posorja Punto 3.2 Código (PP P3.2)	
	1	52,37	Puerto "El Morro" Punto 3.2 Código (PM P3.2)	

Fuente: Bustamante y Romero, (2023).

De los 16 hongos seleccionados, 11 fueron aislados de las muestras procedentes de Puerto "El Morro" y 5 de Puerto de Posorja, con diámetros del halo de crecimiento entre 33,76 mm en Puerto Posorja P3.2 y 48,67 mm en Puerto "El Morro" P3.1 para Cd; 15,95 mm en Puerto "El Morro" P2.1 (taxón con halo de inhibición de levaduras) y 85,09 mm en Puerto "El Morro" P1.1 para Cr; 26,47 mm en Puerto Posorja P2.1 y 52,37 mm en Puerto "El Morro" P3.2 para As.

Un criterio de discriminación para disminuir el número de muestras fue el observar estructuras alteradas por procesos de adaptación a metales en medio de cultivo suplementado con la mínima concentración de contaminante (0,5 ppm).

La tendencia a mayor presencia de microorganismos en el sedimento marino de Puerto "El Morro" se debe a la disposición de nutrientes residuales en los suelos arcillosos de la zona que permiten la acumulación de iones utilizados por microorganismos como bacterias, hongos y levaduras para crecer (Jia y col., 2017). Se ha reportado que *Bacillus spp.* es tolerante a concentraciones de Cd y Cr, *Aspergillus spp.* a Pb y Cd, y *Saccharomyces cerevisiae* a Cd, Pb y Cr (Navarro Moreno y col., 2022).

En varias investigaciones realizadas sobre la tolerancia de metales pesados por parte de cepas fúngicas evidencian su adaptabilidad a concentraciones de 50, 100 y 250 ppm de Cd y Cr para el género *Penicillium*, 50 ppm de Cd para el género *Mucor*, 50 ppm de Cr para el género *Sporotrichum* García (2004) y 30 mM de As para el género *Metarhizium* (Lopez Perez y col., 2019).

Las condiciones como pH moderado (6,0 a 7,0) y conductividad moderada a baja evidencian un aumento de la distribución microbiológica ante la fácil adaptabilidad de los microorganismos en comparación a niveles de pH más ácidos y conductividad más alta que reducen el desarrollo de bacterias, mohos y levaduras (M. Romero y col., 2008). Además, se destaca la variedad de mecanismos de los microorganismos para la unión a metales pesados, como los hongos que pueden adsorber a nivel celular los contaminantes mediante interacciones fisicoquímicas o acumular metales en procesos intracelulares o extracelulares, esto demuestra la capacidad para propagarse en concentraciones mínimas y máximas de contaminante (Navarro Moreno y col., 2022).

En el Anexo 7 se detalla el crecimiento en concentraciones de metales pesados mínimas (valor propio del muestreo) y máximas (valor bibliográfico) de los 16 taxones seleccionados previo a la discriminación de los taxones para el tratamiento.

4.4.2 Resultados de resiembra en concentración mínima y máxima de contaminantes

Después de 7 días en incubación a 24°C se visualizaron, como detalla la Tabla 11, los taxones de hongos que pudieron desarrollarse y adaptarse al medio de cultivo PDA suplementado con metales pesados en concentración máxima y mínima.

Tabla 10. Desarrollo de taxones expuestos a concentraciones mínimas y máximas de contaminante.

Metal	Punto de muestreo	Crecimiento	
		Concentración mínima	Concentración máxima
Cd	PM P1.1	+++	++
	PP P1.1	+++	+
	PM P3.1	-	+
	PP P3.2	++	+
	PM P3.2	++	+
Cr	PM P3.1	++	+
	PM P4.2	-	-
	PM P2.1	+	-
	PM P1.1	-	-
	PM P3.2	-	-
As	PM P4.2	+++	+++
	PM P1.1	++	++
	PP P2.1	+	-
	PM P3.2	++	+
	PP P3.2	+++	++
	PP P4.2	+++	+++

Nota: Los signos representan: (-): no crecimiento; (+): crecimiento bajo; (++): crecimiento medio; (+++): crecimiento alto.

Fuente: Bustamante y Romero, (2023).

Los puntos de muestreo más representativos para el desarrollo de colonias funcionales en presencia de contaminante en concentración máxima fueron: PM P 1.1 para Cd, PM P3.1 para Cr y PP P4.2 para As, la selección se basó en la capacidad de adaptación y que provengan de diferentes zonas de muestreo.

La adaptabilidad de estos taxones se puede ver influenciada por formación de complejos y cristalización, transformación mediante reacciones de oxidación, reducción, metilación y desalquilación de metales y biosorción celular; que corresponden a los mecanismos biológicos que se activan en los hongos al verse afectados por metales pesados (Navarro Moreno y col., 2022).


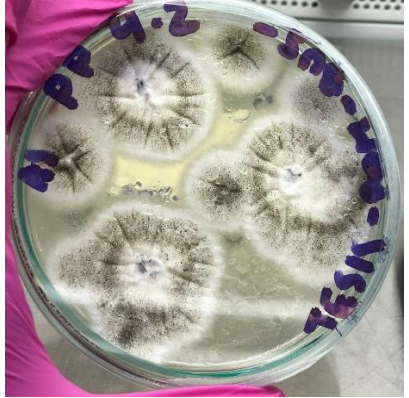
4.5 Caracterización morfológica e identificación de taxones de hongos

Los hongos seleccionados para el tratamiento experimental de remoción de metales pesados (Cd, Cr, As) fueron escogidos en función de su estructura morfológica adaptable a elevados rangos de contaminación (se muestra resultados en la Tabla 12).

Con base en revisión bibliográfica de “Illustrated Genera of Imperfect Fungi” (Barnet & Barry, 1998), “Microbiología Clínica” (Prats, 2007) y “Larone’s Medically Important Fungi: A Guide to Identification” 6th edition (Walsh y col., 2018) se describieron las características morfológicas a nivel macro y microscópico de los taxones de hongos para su identificación, los rasgos se describen en la Tabla 19, 20 y 21 para cada género identificado.

Tabla 11. Crecimiento de taxones de hongos seleccionados para identificación morfológica.


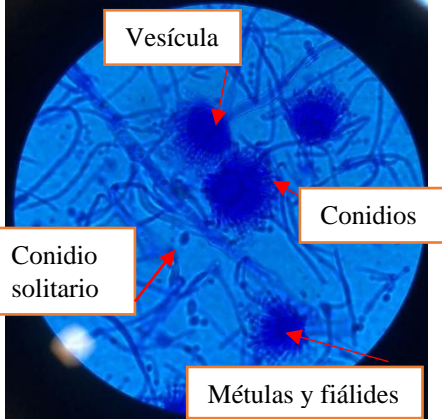
Metal	Descripción	Hongo aislado en medio PDA sin metal pesado
Cd	Puerto “El Morro” Punto 1.1	

<p style="text-align: center;">Cr</p>	<p style="text-align: center;">Puerto “El Morro” Punto 3.1</p>	
<p style="text-align: center;">As</p>	<p style="text-align: center;">Puerto Posorja Punto 4.2</p>	

Fuente: Bustamante y Romero, (2023).

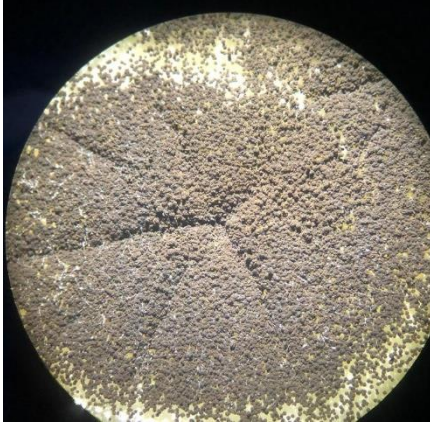
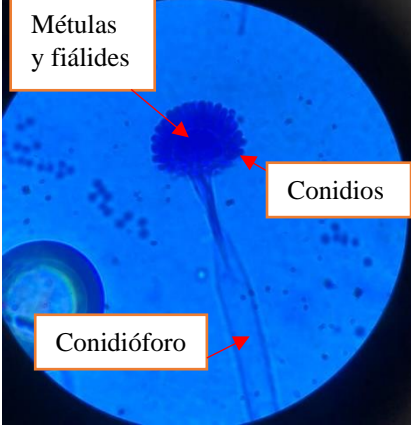
Los hongos aislados para cada metal de estudio demuestran una adaptabilidad eficiente a concentraciones máximas de contaminante a los 5 días de incubación (24°C): 10 ppm Cd, 50 ppm Cr y 8 ppm As.

Tabla 12. Características morfológicas de los hongos seleccionados para tratamiento de remoción de contaminante Cd.

Metal (Cd)	Foto macroscópica	Fotografía microscópica (100x)
<p>Taxón aislado de Puerto “El Morro” Punto 1.1</p>		
<p>Caracterización morfológica</p>	<p>Colonia aterciopelada de color marrón claro y blanco con un centro flocoso.</p>	<p>Conidióforos lisos, vesícula redonda, métulas y fiálides biserialadas largas con conidios redondos, algunos conidios solitarios se producen a lo largo de las hifas.</p>
<p>Microorganismo identificado</p>	<p><i>Aspergillus spp.</i></p>	

Fuente: Bustamante y Romero, (2023).


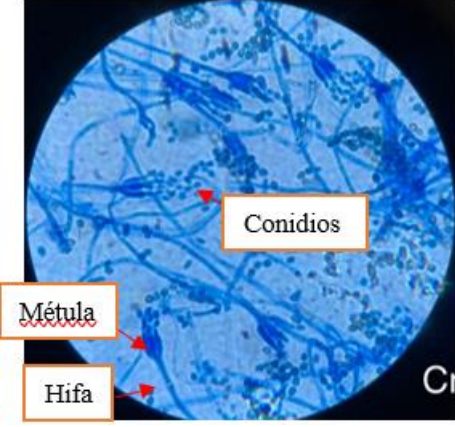
Tabla 13. Características morfológicas de los hongos seleccionados para tratamiento de remoción de contaminantes As.

Metal (As)	Foto macroscópica	Fotografía microscópica (100x)
<p>Taxón aislado de Puerto Posorja Punto 4.2</p>		
<p>Caracterización morfológica</p>	<p>Colonia de apariencia polvorienta de color verde oscuro o negro con periferia blanca (debido a su coloración inicial).</p>	<p>Conidióforos largos y gruesos, vesícula esférica, métulas y fiálides biseriadas que ocupan toda la superficie de la vesícula con conidios oscuros y rugosos.</p>
<p>Microorganismo identificado</p>	<p><i>Aspergillus spp.</i></p>	

Fuente: Bustamante y Romero, (2023).

La identificación del género *Aspergillus* se realizó basado en sus estructuras microscópicas como la forma de conidióforos y vesículas esféricas, disposición de fiálides y métulas en la vesícula, hifas hialinas septadas, presencia de fiálides y esporas globulosas al igual que lo detallan García (2004) y Navarro Moreno y col. (2022) en sus investigaciones.

Tabla 14. Características morfológicas de los hongos seleccionados para tratamiento de remoción de contaminantes Cr.

Metal (Cr)	Foto macroscópica	Fotografía microscópica (100x)
Taxón aislado de Puerto “El Morro” Punto 1.1		
Caracterización morfológica	<p>Colonia aterciopelada de color verde azulado en el centro con borde blanco en la periferia.</p>	<p>Hifas septadas con conidióforos ramificados de forma cilíndrica, denominados métulas, de donde parten de 3 a 6 fiálides ovaladas de las cuales surgen cadenas de conidios sin ramificar.</p>
Microorganismo identificado	<p><i>Penicillium spp.</i></p>	

Fuente: Bustamante y Romero, (2023).

El género *Penicillium* se observa de forma microscópica con hifas hialinas tabicadas, conidióforos ramificados, fiálides con forma ovalada o de frasco y esporas globulosas ubicadas en hileras (Navarro Moreno y col., 2022). García (2004), comparte las mismas características microscópicas detalladas, más el sustento adicional de una prueba molecular de secuenciación génica que le permitió identificar al género *Penicillium*.

4.6 Conteo de esporas para inocular en los tratamientos experimentales

En la Tabla 16 se detallan las concentraciones de esporas utilizadas para los tratamientos experimentales de remoción de metales pesados con respecto a cada hongo con capacidad de biorremediación.

Tabla 15. Células por mililitro para la inoculación de hongos en los tratamientos de remoción de metal pesado.

Metal	Hongo biorremediador	Concentración de esporas (cel/ml)
Cd	<i>Aspergillus spp.</i>	$3,4 \times 10^7$
Cr	<i>Penicillium spp.</i>	$6,7 \times 10^6$
As	<i>Aspergillus spp.</i>	$1,205 \times 10^7$

Fuente: Emily Bustamante y Kathia Romero.

La concentración de esporas para la inoculación de los tratamientos experimentales de remoción de metales pesados se determinó bajo revisión bibliográfica de estudios similares de biorremediación en donde alcanzaron una concentración de 1×10^5 cel/ml de *Aspergillus spp.* y *Penicillium spp.* en 100 ml de medio de cultivo (Guerra Sierra y col., 2014), y 1×10^8 cel/ml de *Aspergillum spp.* (Villalba Villalba & Gómez Azuara, 2019).

4.7 Cuantificación de remoción de metales pesados mediante tratamiento experimental con taxones de hongos

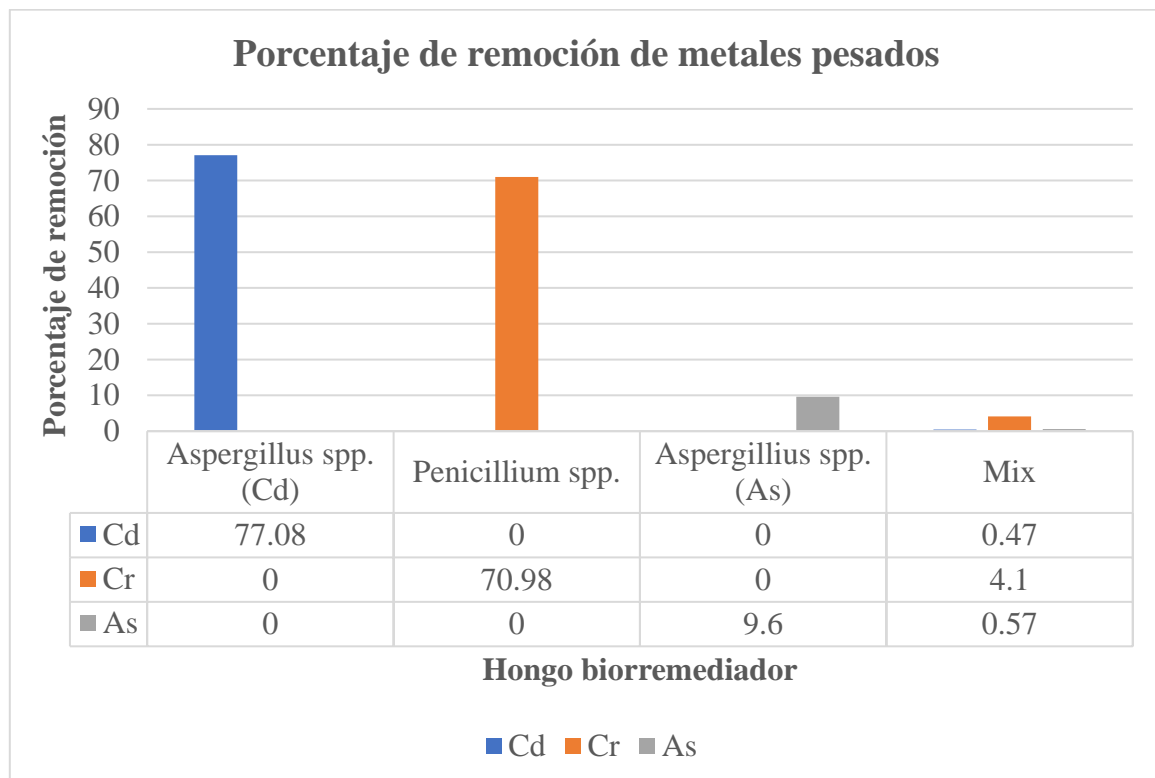
En la Tabla 17 se describen los promedios de remoción de metales pesados durante los 20 días de tratamiento con respecto a cada metal + hongo biorremovedor y el porcentaje de disminución de contaminante.

Tabla 16. Cuantificación de porcentaje de remoción de metales pesados en tratamientos experimentales con hongos.

Metal	Tratamiento	Promedio de la concentración Día 0 (PPM*)	Promedio de la concentración Día 20 (PPM*)	Porcentaje de remoción (%)
Cd	<i>Aspergillus spp.</i>	3,60	0,83	77,08
Cr	<i>Penicillium spp.</i>	15,85	4,60	70,98
As	<i>Aspergillus spp.</i>	3,13	2,83	9,60
Mix	<i>Aspergillus spp.</i>	10,65 (Cd)	1,60 (Cd)	0,47
	+	62,25 (Cr)	59,70 (Cr)	4,10
	<i>Penicillium spp.</i>	8,70 (As)	8,65 (As)	0,57

Fuente: Bustamante y Romero, (2023).

Figura 11. Gráfica de porcentaje de remoción de metales pesados durante el tratamiento experimental con hongos filamentosos.



Fuente: Bustamante y Romero, (2023).

En el Gráfico 11 se puede evidenciar la remoción de los metales pesados de estudio con los géneros de hongos aislados, destacando una remoción mayor de la media en porcentajes de 77,08% Cd con *Aspergillus spp.* y 70,98% Cr con *Penicillium spp.*, estos datos se pueden corroborar con investigaciones que demuestran alto grado de disminución de contaminante en valores de 91,47%, 98,63% y 88,68% para Cd y 50,34%, 88,93% y 58,36% para Cr con los mismos microorganismos (Guerra Sierra y col., 2014); 60 al 70% de Cd por *A. niger* (Massaccesi y col. (2002) como cita Villalba Villalba & Gómez Azuara, 2019).

Por otro lado, el porcentaje de remoción de As por actividad de *Aspergillus spp.* es de 9,6% que se puede comparar con investigaciones previas que detallan biorremediación en valores de 69% y 96% para Cr con *Penicillium spp.* en 24 horas a diferentes concentraciones de biomasa fúngica (Santos-Domínguez y col., 2017).

4.8 Análisis estadístico des la disminución de metales pesados en el tratamiento experimental

La distribución de los datos para los tratamientos individuales de Cd con *Aspergillus spp.*, Cr con *Penicillium spp.*, As con *Aspergillus spp.* y un mix de los 3 hongos + 3 metales, fue normal según el análisis Shapiro-Wick ($p > 0,05$; $n < 30$), permitiendo realizar un estadístico paramétrico T-Student, cálculo de datos descriptivos como media y desviación estándar, para medir la capacidad de remoción de metales pesados por parte de los hongos aislados al implementarlos en tratamientos individuales y en consorcio.

Figura 12. Análisis estadístico paramétrico T-Student de la disminución de metales pesados en el tratamiento experimental.

Paired Samples Test									
Cd		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	INICIAL - FINAL	1.40000	1.58798	.79399	-1.12682	3.92682	1.763	3	.176

Paired Samples Test									
Cr		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	INICIAL - FINAL	7.15000	8.06505	4.03252	-5.68329	19.98329	1.773	3	.174

Paired Samples Test									
As		Paired Differences					t	df	Sig. (2-tailed)
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower	Upper			
Pair 1	INICIAL - FINAL	.16250	.16008	.08004	-.09222	.41722	2.030	3	.135

Fuente: Bustamante y Romero, (2023).

La estadística de T-Student genera p-value mayores a la significancia 0,05 para cada tratamiento del tratamiento, esto permite concluir en una aprobación de la hipótesis nula (H₀) indicando que no hubo remoción significativa de contaminante durante los 20 días de tratamiento, sin embargo, estos valores representan el trabajo de los hongos de manera individual y en consorcio en función de la degradación del metal.

Entre los valores de remoción de contaminante se destaca el porcentaje elevado de disminución de Cd, Cr y As al utilizar los hongos por individual como se detalla en la figura 11 y se puede contemplar en investigaciones que enfatizan la degradación del 77,08% Cd con *Aspergillus spp.*, 70,98% Cr con *Penicillium spp.* y 69% al 96% para Cr con *Penicillium spp.* (Guerra Sierra y col., 2014; Santos-Domínguez y col., 2017).

Esto es un indicativo de que el consorcio de *Aspergillus spp.* y *Penicillium spp.* no es efectivos para biorremediación, los factores que pueden influir en estos resultados son la interacción entre las cepas fúngicas, las concentraciones de contaminantes que pueden inhibir el desarrollo de los hongos por pelea de nutrientes y las condiciones de pH del medio (Morales, 2019).

Capítulo 5

5. Conclusiones y recomendaciones

5.1 Conclusiones

- Se logró evaluar la capacidad removedora de metales pesados (Cr, Cd, As) empleando taxones de hongos filamentosos aislados de sedimentos marinos del Golfo de Guayaquil, Ecuador.
- Se cuantificó el contenido de metales pesados en sedimentos marinos a partir de los sectores puntuales escogidos del Golfo de Guayaquil gracias a la técnica ICP-OES.
- Se lograron aislar tres taxones de hongos del sitio de muestreo más contaminado con metales pesados y se identificó su taxonomía mediante caracterización morfológica y tinción diferencial.
- Los tratamientos establecidos de remoción de metales pesados (Cr, Cd, As) demostraron la eficiencia de los taxones aislados de forma independiente para la biorremediación, comprobados a través de análisis estadísticos.
- Al evaluar los parámetros fisicoquímicos, se puede establecer que, los hongos en su generalidad tienden a prosperar dentro de un intervalo de pH de 5,5 a 8,5. Un pH neutro, alrededor de 7, es adecuado para el crecimiento de la mayoría de los hongos.
- En la biorremediación se considera indispensable controlar también los niveles de pH relativos a la humedad para optimizar la actividad de los hongos que pueden ayudar en la eliminación de estos contaminantes. La humedad adecuada es una de las condiciones ambientales que debe ser considerada para que los hongos desempeñen un papel efectivo de remediación en las aguas contaminadas por metales pesados.
- Por otro lado, se podría decir que, al estudiar la biorremediación en entornos contaminados con sustancias metálicas de alta densidad, es importante considerar el parámetro de conductividad como un factor que afecta la interacción entre los hongos y los metales pesados del agua y sedimentos.

5.2 Recomendaciones

- Es importante recordar que diferentes especies de hongos pueden tener preferencias de niveles de pH para su desarrollo, por lo que es importante investigar las condiciones específicas de crecimiento para el tipo de hongo que se va a cultivar. Además, factores como los nutrientes y temperatura ejecutan una función fundamental en el crecimiento de hongos, por lo que es esencial considerar estos factores junto con el pH.
- Se sugiere implementar los taxones de hongos en tratamientos para metales de forma individual, debido a la mejor bioadsorción y bioacumulación que representan.
- Para la cuantificación de las concentraciones de metales pesados es necesario formular códigos de muestras que se rotulen en los tubos de análisis.
- Variar los niveles de contaminante en los tratamientos de biorremediación para una generar mayor cantidad de data sobre la actividad de los taxones.

Bibliografía

Aguirre, N., Villamizar R., L., Espinel C., C., & Cotes P., A. M. (2009). *Efecto del pH y de la actividad de agua sobre el desarrollo de Nomuraea rileyi (Hyphomycetes)*.

Aguirre Torres, G. (2019). El turismo sostenible comunitario en Puerto el Morro: análisis de su aplicación e incidencia económica. *Revista Universidad y Sociedad*, 11(1), 289-294. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2218-36202019000100289&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Alcívar Tenorio, M., Mosquera Armijo, J., & Castro Rendón, R. (2011). *CONCENTRACIÓN DE METALES PESADOS (CR TOTAL, PB, CD) EN AGUA SUPERFICIAL Y SEDIMENTOS EN EL ESTERO SALADO (GUAYAQUIL)*.

Alexander Molina Álava, D., Enrique Villegas Yagual MAE, F., Eulalia Coka Echeverría, J., & Enrique Villegas Yagual Juana Eulalia Coka Echeverría, F. (s. f.). *EL MORRO*. www.eumed.net/rev/caribe/2018/11/funcionamiento-camaroneras.html

Avilés, E. (2022). *Golfo de Guayaquil*. Enciclopedia del Ecuador. <https://www.encyclopediadelecuador.com/golfo-de-guayaquil/>

Banchón Adum, J. E. (2015). *Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial Parroquia Rural Posorja*.

Barnet, H. L., & Barry, B. H. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi-fourth edition*. https://www.academia.edu/35499449/Illustrated_genera_of_imperfect_fungi_fourth_edition_Barnett_y_Hunter_pdf_pdf

Belmonte Serrato, F., Romero Díaz, A., Alonso Sarría, F., Moreno Brotóns, J., & Rojo López, S. (2010). AFECCIÓN DE SUELOS AGRÍCOLAS POR METALES PESADOS EN ÁREAS LIMÍTROFES A EXPLOTACIONES MINERAS DEL SURESTE DE ESPAÑA. *Universidad de Murcia*, 45-54, 51-52. <https://revistas.um.es/geografia/article/view/114381/108381>

Beltrán-Pineda, M. E., & Gómez-Rodríguez, A. M. (2016). Biorremediación de metales pesados cadmio (Cd), cromo (Cr) y mercurio (Hg), mecanismos bioquímicos e

ingeniería genética: una revisión. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 12(2), 172-197.
<https://doi.org/10.18359/rfcb.2027>

Blanco Hernández, A. L., Gutiérrez, D. A., Jiménez de Blas, O., Santiago Guervós, M., & Manzano, B. de M. (1998). *ARSENICO LIMITE*. 72(1), 53-65.
https://www.scielo.org/article/ssm/content/raw/?resource_ssm_path=/media/assets/res/p/v72n1/plomo.pdf

Calabuig, S. (2017). La higienización en la industria de conservas de pescado: puntos críticos. *Tecnoalimen*, 18.

Cañedo, V., & Ames, T. (2004). *MANUAL DE LABORATORIO PARA EL MANEJO DE HONGOS ENTOMOPATÓGENOS*. www.cipotato.org

Carballo Hondal, O., Arencibia Carballo, G., Concepción, J., & Isla Molleda, M. (2003). Los Bioensayos de Toxicidad en Sedimentos Marinos. *Revista de Toxicología*, 33-69.
<http://www.sertox.com.ar/retel/default.htmSertox>

Cárdenas, J., Moctezuma, M., & Acosta, I. (2015). *AISLAMIENTO DE HONGOS RESISTENTES A METALES PESADOS A PARTIR DE AGUA DE DIFERENTES*.
<https://www.eumed.net/rev/tlatemoani/01/iar.htm>

Cartaya, O., Reynaldo, I., & Peniche, C. (2008). Cinética de adsorción de iones cobre (II) por una mezcla de oligogalacturónidos. *Revista Iberoamericana de Polímero*, 9(5), 473-479. <https://www.researchgate.net/publication/28268980>

Casal, J., & Mateu, E. (2003). TIPOS DE MUESTREO. *Rev. Epidem. Med. Prev*, 1, 3-7.

CCME. (2003). *Canadian Council of Ministers of the Environment | Le Conseil canadien des ministres de l'environnement*. <https://ccme.ca/en/results/9,20,61,63/ch/1,2,3,4,5,6>

Ceiro I, W. G., Arévalo, J. I., Puertas I, A. L., & Hidalgo-Díaz, L. I. (2014). Efecto de concentraciones de NaCl sobre el crecimiento micelial y la esporulación de *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare y Gams en medio PDA y suelo. *Rev. Protección Veg*, 29(2), 122-127.

Cervantes, C., Espino-Saldaña, A. E., Acevedo-Aguilar, F., León-Rodríguez, I. L., Rivera-Cano, M. E., Avila-Rodríguez, M., Wróbel-Kaczmarczyk, K., Wróbel-Zasada, K., Gutiérrez-Corona, J. F., Rodríguez-Zavala, J. S., & Moreno-Sánchez, R. (2006). Interacciones

microbianas con metales pesados. En *Revista Latinoamericana de MICROBIOLOGÍA MICROBIOLOGÍA* (Vol. 48, Número 2).

Chang, J., Shi, Y., Si, G., Yang, Q., Dong, J., & Chen, J. (2020). The bioremediation potentials and mercury(II)-resistant mechanisms of a novel fungus *Penicillium* spp. DC-F11 isolated from contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 396, 122638. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2020.122638>

Contreras Pérez, J., Mendoza Gómez, C., & Gómez, A. (2004). Determinación de metales pesados en aguas y sedimentos del Río Haina. *Ciencia y Sociedad*, 29(1), 38-71. <https://repositoriobiblioteca.intec.edu.do/handle/123456789/1055>

Dell'anno, F., Rastelli, E., Buschi, E., Barone, G., Beolchini, F., & Dell'anno, A. (2022). Fungi Can Be More Effective Than Bacteria for the Bioremediation of Marine Sediments Highly Contaminated with Heavy Metals. *Microorganisms*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10050993>

Diana, D., & Vullo, L. (2003). *MICROORGANISMOS Y METALES PESADOS: UNA INTERACCIÓN EN BENEFICIO DEL MEDIO AMBIENTE*. www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar

Durán Albuja, A. (2022). CAMARONERAS REGISTRADAS Y APROBADAS. *SUBSECRETARÍA DE CALIDAD E INOCUIDAD - S.C.I.* <https://www.produccion.gob.ec/wp-content/uploads/2022/10/CAMARONERAS-GR-17102022-2.pdf>

Elena Lopez Perez, M., Cristina, M., & Rincón-Castro, D. (2019). *IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS Y HONGOS DE IMPORTANCIA BIOTECNOLÓGICA EN LA RESISTENCIA A ARSÉNICO*. <https://www.researchgate.net/publication/333825749>

EPA 3051. (2018). *MICROWAVE ASSISTED ACID DIGESTION OF SEDIMENTS, SLUDGES, SOILS, AND OILS*.

Ferré-huguet, N., Schuhmacher, M., Llobet, J. M., & Domingo, J. L. (2007). METALES PESADOS Y SALUD. *MAPFRE SEGURIDAD*, 50-58.

Fisher Scientific Inc, T. (s. f.). *Smart Note: What are the Benefits and Considerations of Upgrading to ICP-OES from AAS?*

Frioni, L. (2005). *Microbiología Básica, ambiental y agrícola*. 9-118.

Fuenmayor, G., Jonte, L., Rosales Loaiza, N., & Morales, E. (2009). Crecimiento de la cianobacteria marina *Oscillatoria* sp. MOF-06 en relación al pH en cultivos discontinuos. *Scielo*, 29(1).
http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562009000100005

García, M. (2004). *AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS TOLERANTES A METALES PESADOS EN EL PROCESO DE LODOS ACTIVADOS EN UNA PLANTA DE TRATAMIENTO DE AGUA RESIDUAL.*

Giralda, A. (2020). *INSTRUCTIVO PREPARACIÓN DE SUELOS Y SEDIMENTOS PARA ANÁLISIS.*
<http://www.geologia.unam.mx/igl/deptos/edafo/lfs/MANUAL%20DEL%20LABORATORIO%20DE%20FISICA%20DE%20>

Go Raymi. (2022). *Posorja.* <https://www.goraymi.com/es-ec/guayas/guayaquil/rurales/posorja-ab701044e>

Goicochea-Trelles, P. A., & Garcia-Lopez, Y. J. (2022). Fitorremediación para recuperar suelos contaminados por metales pesados: discusión de revisión sistemática. *Agroindustrial Science*, 12(3), 293-303.
<https://doi.org/10.17268/AGROIND.SCI.2022.03.08>

Guadalupe Reyes-Navarrete, M., Irene Alvarado-de la Peña, A., Magdalena Antuna, D., García-Vargas, A., Silvia González-Valdez, L., & del Carmen Vázquez -Alarcón, E. (s. f.). *METALES PESADOS: IMPORTANCIA Y ANALISIS.*

Guarco, K. (2015). *Tratamiento del Sedimiento Marino del Ramal B del Estero Salado de Guayaquil, por el Método «Soil-Washing», para la Remoción de Metales Pesados.* <http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/38215>

Guerra Sierra, B. E., Sandoval Meza, A. X., Manrique González, L. S., & Barrera Rangel, S. P. (2014). Ensayos preliminares in vitro de biosorción de cadmio cepas fúngicas nativas de suelos contaminados. *Innovaciencia Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 2(1), 53. <https://doi.org/10.15649/2346075X.256>

Hansen, A. M., García Chevesich, P., De, M., & Doria, F. (2022). Congreso iberoamericano sobre sedimentos y ecología. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 38, 81-86. <https://doi.org/10.20937/RICA.54798>

Hassan, A., Pariatamby, A., Ossai, I. C., & Hamid, F. S. (2020). Bioaugmentation assisted mycoremediation of heavy metal and/metalloid landfill contaminated soil using consortia of filamentous fungi. *Biochemical Engineering Journal*, 157, 107550. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2020.107550>

Hernández, O. (2022). *¿Cómo se realiza un conteo en una cámara Neubauer o Petroff-Hauser?*

Herrera Núñez, J., Rodríguez Corrales, J., Coto Campos, J., Salgado Silva, V., & Borbón Alpizar, H. (2013). Evaluación de metales pesados en los sedimentos superficiales del río Pirro. *Tecnología en Marcha*, 26(1), 27-36.

Heubeck, C., Raitzsch, M., Völker, D., & Wiedicke-Hombach, M. (2010). *Capítulo 6.2 Sedimentación*. 52-59.

Hidalgo, C., & Osorio, E. (2013). *Evaluación y determinación de la capacidad secuestrante de los metales pesados cromo (Cr) y cadmio (Cd) por taxas de mohos aisladas de los alrededores de los ríos Cutuchi y Machángara*.

Hoshino, T., Doi, H., Uramoto, G. I., Wörmer, L., Adhikari, R. R., Xiao, N., Morono, Y., D'Hondt, S., Hinrichs, K. U., & Inagaki, F. (2020). Global diversity of microbial communities in marine sediment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(44). <https://doi.org/10.1073/pnas.1919139117>

Instituto de Catálisis y Petroquímica. (2019). *ESPECTROSCOPIA DE EMISIÓN ATÓMICA ICP-OES*.

ISO 5667-12. (2017). *Water quality-Sampling-Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments from rivers, lakes and estuarine areas*. www.iso.org/tech/STANDARD/PREVIEW

Jia, Z., Deng, J., Chen, N., Shi, W., Tang, X., & Xu, H. (2017). Bioremediation of cadmium-dichlorophen co-contaminated soil by spent *Lentinus edodes* substrate and its effects on microbial activity and biochemical properties of soil. *Journal of Soils and Sediments*, 17(2), 315-325. <https://doi.org/10.1007/S11368-016-1562-7/METRICS>

Jiménez Verdesoto, D. B. (2012). *CUANTIFICACIÓN DE METALES PESADOS (CADMIO, CROMO, NIQUEL Y PLOMO) EN AGUA SUPERFICIAL, SEDIMENTOS Y*

*ORGANISMOS (Crassostrea columbiensis) OSTIONDE MANGLE EN EL PUENTE
PORTETE DEL ESTERO SALADO(GUAYAQUIL).*

http://scholar.googleusercontent.com/scholar?q=cache:VS72pCNaD3oJ:scholar.google.com/+cromo+golfo+de+guayaquil&hl=es&as_sdt=0,5&scioq=cromo+golfo+de+guayaquil

Joshi, P. K., Swarup, A., Maheshwari, S., Kumar, R., & Singh, N. (2011). Bioremediation of Heavy Metals in Liquid Media Through Fungi Isolated from Contaminated Sources. *Indian Journal of Microbiology*, 51(4), 482-487. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0110-9>

Kabata-Pendias, A., & Pendias, H. (2001). *Trace Elements in Soils and Plants, Third Edition*. www.crcpress.com

Kravetz, S., Rodríguez Castro, M. C., Vilches, C., Huta, F., & Giorgi, A. (2023). Hongos y algas como indicadores de la calidad del agua de un arroyo urbano. *Ecología Austral*, 33(2), 567-582. <https://doi.org/10.25260/ea.23.33.2.0.2088>

Lin, Y., Xiao, W., Ye, Y., Wu, C., Hu, Y., & Shi, H. (2020). Adaptation of soil fungi to heavy metal contamination in paddy fields—a case study in eastern China. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(22), 27819-27830. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09049-9>

López Jiménez, M. A., Monks, S., Serrano, A., Pulido Flores, G., Gaytan Oyarzun, J. C., & López Ortega, M. (2012). Dinámica de las variables fisicoquímicas del sedimento de la laguna de Tampamachoco, Veracruz; México. En *Revista Científica UDO Agrícola* (Vol. 12, Número 4).

Lorena, B., Llanos, V., & Stewart, A. (s. f.). *COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS (ICP-OES VS. ICP-MS) PARA LA DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO EN AGUA Tesis para la obtención del título de LICENCIATURA EN BROMATOLOGÍA*. www.alexstewart.com.ar

Lucio-Flores, S. A., Otazo-Sánchez, E. M., Romero-Bautista, L., & Gaytán-Oyarzún, J. C. (2021). Hongos macroscópicos como bioacumuladores de metales pesados. *Pädi Boletín Científico de Ciencias Básicas e Ingenierías del ICBI*, 8(16), 60-65. <https://doi.org/10.29057/ICBI.V8I16.5823>

Martín Moreno, C., González Becerra, A., & Blanco Santos, M. J. (2004). Tratamientos biológicos de suelos contaminados: Contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. En *Revista Iberoamericana de Micología* (Vol. 21, Número 3).

Medina, L., Tuozzo, A., Herrera, J., Perozo, Y., & González, L. (1999). *ESTUDIO DE HONGOS EN BIBLIOTECAS DE LA UNIVERSIDAD DE CARABOBO-VALENCIA* (Vol. 3). <http://servicio.bc.uc.edu.ve/fcs/vol3n1/3estu.pdf>

Medina, M. A., & Pozo, P. (s. f.). *MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA DETERMINATION OF HEXAVALENT CHROMIUM IN WASTEWATER DISCHARGE OF A TANNERY, LOCATED IN THE FIELD OF IZAMBA, AMBATO IN THE PROVINCE OF TUNGURAHUA, BY ATOMIC ABSORPTION.*

Mejía Sandoval, G. (2006). Aproximación teórica a la biosorción de metales pesados por medio de microorganismos. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 1(1), 77-94. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=321428096010>

Mero, M., Arcos, V., Egas, F., Siavichay, R., & Lindao, G. (2012). Determinación de metales pesados (cd y pb) en moluscos bivalvos de interés comercial (anudara tuberculosa y a. Grandes) de puerto el morro, Ecuador. *Investigación, Tecnología e Innovación*, 4(4), 19-32. <https://doi.org/10.53591/iti.v4i4.107>

Ministerio del Ambiente Agua y Transición Ecológica. (2022). *El Morro, un paraíso costero rodeado de mangles*. <https://www.ambiente.gob.ec/el-morro-un-paraiso-costero-rodeado-de-mangles/>

Ministerio del Ambiente Ecuatoriano. (2012). *Norma de Calidad Ambiental del Recurso Suelo y Criterios de Remediación para Suelos Contaminados*. <https://faolex.fao.org/docs/pdf/ecu112181.pdf>

Mitra, S., Chakraborty, A. J., Tareq, A. M., Emran, T. Bin, Nainu, F., Khusro, A., Idris, A. M., Khandaker, M. U., Osman, H., Alhumaydhi, F. A., & Simal-Gandara, J. (2022). Impact of heavy metals on the environment and human health: Novel therapeutic insights to counter the toxicity. *Journal of King Saud University - Science*, 34(3). <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.101865>

Morales, L. (2019). *INFLUENCIA DEL pH, CONDUCTIVIDAD, CONTENIDO DE C INORGÁNICO, MATERIA ORGÁNICA Y DE LOS METALES Fe.*

Morales Santos, L. O. (2019). *INFLUENCIA DEL pH, CONDUCTIVIDAD, CONTENIDO DE C INORGÁNICO, MATERIA ORGÁNICA Y DE LOS METALES Fe, Mn, Al EXTRAÍBLES SOBRE LA ADSORCIÓN DE FÓSFORO EN LA FRACCIÓN LIMO-ARCILLA DE LOS SEDIMENTOS DE LAS LAGUNAS UNARE Y PÍRITU, EDO. ANZOÁTEGUI.*

<http://saber.ucv.ve/bitstream/10872/20534/1/Leidy%20Tesis%20geoquimica.pdf>

Muñoz Silva, L., Olivera Gonzales, P., Santillán Torres, M., & Tamariz Angeles, C. (2019). Trabajos originales Microorganismos tolerantes a metales pesados del pasivo minero Santa Rosa, Jangas (Perú) Heavy metals tolerant microorganisms from mine tailing wastelands Santa Rosa, Jangas (Peru). *Revista peruana de biología*, 26(1), 109-118. <https://doi.org/10.15381/rpb.v26i1.15914>

Muñoz-Silva, L., Olivera-Gonzales, P., Santillán-Torres, M., & Tamariz-Angeles, C. (2019). Heavy metals tolerant microorganisms from mine tailing wastelands Santa Rosa, Jangas (Peru). *Revista Peruana de Biología*, 26(1), 109-118. <https://doi.org/10.15381/rpb.v26i1.15914>

Narrea Cango, M., & Malpartida Zevallos, J. (2006). *Evaluación de medios de cultivo en la producción de conidias y crecimiento diametral de cuatro cepas del hongo entomopatógeno Beauveria brongniartii (Saccardo) Petch.*

National Center for Environmental Health. (2020). *Los mohos (hongos) en el medio ambiente.*

Navarrete-Forero, G., Morales Baren, Lady, Dominguez-Granda, L., Pontón Cevallos, J., & Marín Jarrín, J. R. (2019). CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS EN EL GOLFO DE GUAYAQUIL: INCLUSO DATOS LIMITADOS REFLEJAN IMPACTOS AMBIENTALES DE LAS ACTIVIDADES ANTRÓPICAS. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 35(3), 731-755. <https://doi.org/10.20937/RICA.2019.35.03.18>

Navarro Moreno, L. G., Vázquez Velasco, L., Rangel Cordero, A., & González, J. (2022). Contaminación y hongos: resistencia a metales pesados. *LATAM Revista*

Latinoamericana de Ciencias Sociales y Humanidades, 3(2), 215-232.
<https://doi.org/10.56712/latam.v3i2.76>

Niu, H., Xu, X. S., Wang, J. H., & Volesky, B. (1993). Removal of lead from aqueous solutions by *Penicillium* biomass. *Biotechnology and Bioengineering*, 42(6), 785-787.
<https://doi.org/10.1002/BIT.260420615>

Ochoa, J. F., & Rodríguez, A. S. (2017). Caracterización molecular y criopreservación de hongos y bacterias asociados a la rizósfera de especies vegetales acumuladoras de metales pesados en suelos contaminados por minería. En *Bionatura*. Centro de Biotecnología y Biomedicina, Clinical Biotec. Universidad Católica del Oriente (UCO), Univesidad Yachay Tech. <https://doi.org/10.21931/RB/2017.02.02.3>

Octavio-Aguilar, P., & Olmos-Palma, D. A. (2022). Efectos sobre la salud del agua contaminada por metales pesados. *Herreriana*, 4(1), 43-47.
<https://doi.org/10.29057/H.V4I1.8630>

Olivia Cañizares-villanueva, R. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. En *Revista Latinoamericana de Microbiología*.

Oña, T., & Gualoto, M. (2022). *BIORREMEDIACIÓN AMBIENTAL*. Editorial Universidad Técnica del Norte UTN. <https://issuu.com/utnuniversidad/docs/ebook-biorremediacion>

Ortega-Pacheco, D., Mendoza-Jiménez, M. J., Herrera, P., & Albán, M. (2020). Políticas de Conservación de Manglar en el Golfo de Guayaquil. *INVESTIGATIO*, 14, 12-26.
<https://doi.org/10.31095/INVESTIGATIO.2020.14.2>

Ortiz Catón, M., Alatorre Rosas, R., Valdivia Bernal, R., Ortiz Catón, A., Medina Torres, R., & Alejo Santiago, G. (2011). EFECTO DE LA TEMPERATURA Y HUMEDAD RELATIVA SOBRE EL DESARROLLO DE LOS HONGOS ENTOMOPATÓGENOS. En *Revista Biociencias Enero* (Vol. 1). <http://www.biocontrol>.

Ortiz García, J. E., Mejía Agudelo, Y., González Morales, D. E., García-Alzate, L. S., & Cifuentes-Wchima, X. (2020). Alternativa de biorremediación a partir de residuos de cacao en la obtención de hongos *Pleurotus ostreatus* con la implementación de un análisis multicriterio. *Revista ION*, 33(1). <https://doi.org/10.18273/revion.v33n1-2020007>

Pabón S.E., Benítez R., Sarria Villa R.A., & Gallo J.A. (2020). Contaminación del agua por metales pesados, métodos de análisis y tecnologías de remoción. Una revisión. *Dialnet*, 14(27), 9-18.

Pacsi Achahui, M., & Cañari Díaz, J. (s. f.). *Método de Biolixiviación Mediante la Aplicación de Hongos Filamentosos en Diversas Fuentes de Contaminación: Revisión sistemática*.

Paz Barzola, D. M. (2021). *Geoquímica de metales pesados en Golfo de Guayaquil; implicancias ambientales*.

Pérez Martínez, I., & Romero, F. M. (2015). *Uso de parámetros indirectos para la evaluación de la contaminación de suelos por metales pesados en una zona minera de San Luis Potosí, México* (Número 1).

Pernia, B., & Cornejo, X. (2019). *Impactos de la contaminación sobre los manglares de Ecuador*. <https://www.researchgate.net/publication/337424161>

Pernía Santos, B. M., Mero, M., Cornejo, X., Ramírez-Prado, N., Ramírez, L., Bravo, K., López, D., Muñoz, J., & Zambrano, J. (2018a). Determinación de cadmio y plomo en agua, sedimento y organismos bioindicadores en el Estero Salado, Ecuador. *Enfoque UTE*, 9(2), 89-105. <https://doi.org/10.29019/ENFOQUEUTE.V9N2.246>

Pernía Santos, B. M., Mero, M., Cornejo, X., Ramírez-Prado, N., Ramírez, L., Bravo, K., López, D., Muñoz, J., & Zambrano, J. (2018b). Determinación de cadmio y plomo en agua, sedimento y organismos bioindicadores en el Estero Salado, Ecuador. *Enfoque UTE*, 9(2), 89-105. <https://doi.org/10.29019/ENFOQUEUTE.V9N2.246>

Pietro-Souza, W., de Campos Pereira, F., Mello, I. S., Stachack, F. F. F., Terezo, A. J., Cunha, C. N. da, White, J. F., Li, H., & Soares, M. A. (2020). Mercury resistance and bioremediation mediated by endophytic fungi. *Chemosphere*, 240, 124874. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2019.124874>

Porras, Á. C. (s. f.). *DESCRIPCIÓN DE LA NOCIDIDAD DEL CROMO PROVENIENTE DE LA INDUSTRIA CURTIEMBRE Y DE LAS POSIBLES FORMAS DE REMOVERLO* (Vol. 9, Número 17).

Prats, G. (2007). *Microbiología Clínica*. EDITORIAL CLÍNICA PANAMERICANA.

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

Prieto Méndez, J., González, C., Román, A., & Prieto, F. (2009). Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10(1), 29-44.
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93911243003>

Proaño Alvarado, M. del C. (2016). *Análisis espacial de concentraciones de metales pesados en agua y sedimentos en la Reserva Ecológica Manglares de Churute*.

Puga, S., Sosa, M., Lebgue, T., Quintana, C., & Campos, A. (2006). Contaminación por metales pesados en suelo provocada por la industria minera: Heavy metals pollution in soils damaged by mining industry. *Ecología Aplicada*, 5(1-2), 149-155.
http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-22162006000100020&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Quispe, D. (2020). Revisión bibliográfica del uso de hongos para la biorremediación de suelos contaminados por metales pesados. En *Universidad Andina del Cusco*.

Ramos Vásquez, E., & Dávila, D. Z. (2008). EFECTO DE LA HUMEDAD, TEMPERATURA Y PH DEL SUELO EN LA ACTIVIDAD MICROBIANA A NIVEL DE LABORATORIO SOIL MICROBIAL ACTIVITY IN RESPONSE TO DIFFERENT CONDITIONS OF MOISTURE, TEMPERATURE OR PH. *Ecología Aplicada*, 7(1).

Reyes, Y. C., Vergara, I., Torres, O. E., Díaz, M., & González, E. E. (2016). *Heavy metals contamination: implications for health and food safety*. 16, 66-77.

Ribón Lozano, B., & Naharro Ferrero, D. (2019). *Espectroscopía de Plasma ICP-OES*. Laboratorio de Técnicas Instrumentales UVA.
<https://laboratoriotecnicasinstrumentales.es/analisis-quimicos/espectroscopa-de-plasma-icp-oes>

Rodríguez Moreira, A. (2006). CONTAMINACION POR RESIDUO DE HIDROCARBURO DEL PETROLEO EN EL PUERTO MARITIMO DE GUAYAQUIL Y SU AREA DE INFLUENCIA DEBIDO A ACTIVIDADES NAVIERAS, PERIODO 1984 AL 2004. *ACTA OCEANOGRAFICA DEL PACIFICO.*, 103(1).

Romero, E., Melendres, K. P., Ángel, L., & Polo, T. (s. f.). *CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS Y MICROSCÓPICAS DE HONGOS.*

Romero, M. P., Santamaría, D. M., & Zafra, C. A. (s. f.). *BIOINGENIERÍA Y SUELO: ABUNDANCIA MICROBIOLÓGICA, pH Y CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA BAJO TRES ESTRATOS DE EROSIÓN BIOENGINEERING AND SOIL: MICROBIOLOGICAL ABUNDANCE, pH AND ELECTRICAL CONDUCTIVITY UNDER THREE STRATES OF EROSION.*

Salcedo-Martínez, S., Moreno-Limón, S., & Rocha-Estrada, A. (2019). BIORREMEDIACIÓN CON ALGAS. En *PLANTA* (Vol. 15, pp. 24-29). https://www.chilebio.cl/wp-content/uploads/2020/05/Planta_26_compressed.pdf#page=24

Samacá Ruíz, C., & Mogollón Quintero, C. (2014). *Evaluación de las concentraciones de plomo, cadmio y cromo contenido en el material particulado menor a 10 micrómetros y establecimiento de asociaciones con las fuentes de emisión existentes en la localidad de Los Mártires - Bogotá D.C.* https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_ambiental_sanitaria

Sandoval, G. M. (2006). *Aproximación teórica a la biosorción de metales pesados por medio de microorganismos Theoretical approximation to the biosorption of heavy metals using microorganisms. 1(1).*

Santos-Domínguez, E. E., Vargas-Morales, J. M., Cárdenas-González, J. F., & Acosta-Rodríguez, I. (2017). Remoción de arsénico (V) en solución acuosa por biomasa modificada del hongo aspergillus Niger. *Informacion Tecnologica*, 28(6). <https://doi.org/10.4067/S0718-07642017000600006>

Sr Jorge Banchón Adoum Secretaria Tesorera Cpa Marie Quineche Representante del Cuerpo Legislativo Sr Aurelio Morán Vera, P., Vicente Rene Solórzano Rodríguez Sr Eloy Crespín Ponce Sr Pedro Eloy Vera Ponguillo Elaboración, S., & Biofísico Mgst Andrés Tapia Arias, C. (2015). *Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial Parroquia Rural Posorja CRÉDITOS Consejo de Planificación Representantes de la Ciudadanía.*

Suarez Crespín, W. S. (2017). *ESTUDIO DE FACTIBILIDAD PARA EL DISEÑO DE UN SISTEMA CATALIZADOR PARA EL TRATAMIENTO DEL AMONIACO QUE ES REGULADO POR LAS PURGAS Y EVITAR LA CONTAMINACIÓN AMBIENTAL EN LA EMPRESA SALICA DEL ECUADOR S.A., UBICADO EN LA PARROQUIA*

POSORJA, PROVINCIA DEL GUAYAS.

<https://repositorio.upse.edu.ec/bitstream/46000/4481/1/UPSE-TII-2018-0041.pdf>

Taft, R. A., & Jones, C. (2001). *Sediment Sampling Guide and Methodologies*.

Talukdar, D., Jasrotia, T., Sharma, R., Jaglan, S., Kumar, R., Vats, R., Kumar, R., Mahnashi, M. H., & Umar, A. (2020). Evaluation of novel indigenous fungal consortium for enhanced bioremediation of heavy metals from contaminated sites. *Environmental Technology & Innovation*, 20, 101050. <https://doi.org/10.1016/J.ETI.2020.101050>

Thermo Fisher. (2018). *iCAP 7000 Plus Series ICP-OES Operating Manual*.

Tomaila, J., & Iannacone, J. (2018). Toxicidad letal y subletal del arsénico, cadmio, mercurio y plomo sobre el pez *Parachaeirodon innesi* neon tetra (Characidae). *Asociación Española de Toxicología España*, 35(2), 1-22. <https://www.redalyc.org/journal/919/91960137004/91960137004.pdf>

Union Nations Environment. (2017). *Golfo de Guayaquil*. <https://chm.cbd.int/pdf/documents/marineEbsa/204049/7>

Valle Del Mezquital, D., Antonio Vázquez-Alarcón, M., Cajuste, L. J., Carrillo-González, R., Zamudio-González, B., Álvarez-Sánchez, E., & Castellanos-Ramos, J. Z. (s. f.). *LÍMITES PERMISIBLES DE ACUMULACIÓN DE CADMIO, NÍQUEL Y PLOMO EN SUELOS Permissible Limits of Cadmium, Nickel, and Lead Accumulation in Soil in the Valley of Mezquital*.

Villalba Villalba, A. G., & Gómez Azuara, G. V. (2019). *AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ASPERGILLUS NIGER Y EVALUACIÓN DE SU TOLERANCIA A METALES TÓXICOS*.

Villaveces Palacio, C. D. (2019). *BIOREMEDIATION USING THE ASPERGILLUS NIGER FUNGUS IN WASTEWATER TREATMENT*.

Villaveces Palacios, C. D. (2019). *BIOREMEDIATION USING THE ASPERGILLUS NIGER FUNGUS IN WASTEWATER TREATMENT*. *Universidad Militar Nueva Granada*, 23. [moz-extension://3e9c418b-4928-40db-b299-879fe9330de0/enhanced-reader.html?pdf=https%3A%2F%2Frepositorio.unimilitar.edu.co%2Fbitstream%2F10654%2F32776%2F1%2FVillavecesPalacioCarlosDaniel2019.pdf.pdf](https://3e9c418b-4928-40db-b299-879fe9330de0/enhanced-reader.html?pdf=https%3A%2F%2Frepositorio.unimilitar.edu.co%2Fbitstream%2F10654%2F32776%2F1%2FVillavecesPalacioCarlosDaniel2019.pdf.pdf)

Walsh, T. J., Hayden, R. T., & Larone, D. H. (2018). Larone's Medically Important Fungi. *Larone's Medically Important Fungi*. <https://doi.org/10.1128/9781555819880>

ANEXOS



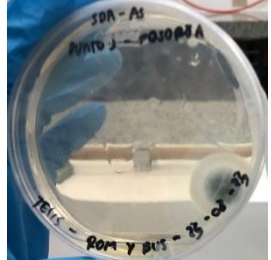

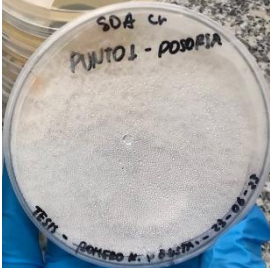
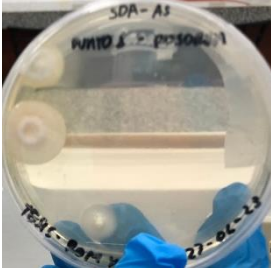
Anexo 1. Concentraciones de Cd, Cr y As en muestras de sedimento marino del Golfo de Guayaquil.

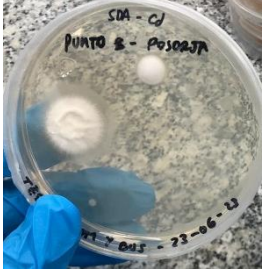
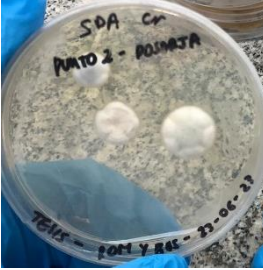




Muestras	Concentraciones					
	Cd		Cr		As	
	Valor*	PPM	Valor	PPM	Valor*	PPM
*	*	**	*	*	*	
Puerto Posorja Punto 1.1	0,017	1,7	0,431	43,1	0,031	3,1
Puerto Posorja Punto 1.2	0,013	1,3	0,309	30,9	0,022	2,2
Puerto Posorja Punto 2.1	0,021	2,1	0,501	50,1	0,045	4,5
Puerto Posorja Punto 2.2	0,019	1,9	0,409	40,9	0,030	3,0
Puerto Posorja Punto 3.1	0,017	1,7	0,406	40,6	0,017	1,7
Puerto Posorja Punto 3.2	0,014	1,4	0,320	32,0	0,025	2,5
Puerto Posorja Punto 4.1	0,011	1,1	0,254	25,4	0,008	0,8
Puerto Posorja Punto 4.2	0,011	1,1	0,254	25,4	0,008	0,8
Puerto "El Morro" Punto 1.1	0,021	2,1	0,516	51,6	0,028	2,8
Puerto "El Morro" Punto 1.2	0,018	1,8	0,425	42,5	0,035	3,5
Puerto "El Morro" Punto 2.1	0,022	2,2	0,538	53,8	0,046	4,6
Puerto "El Morro" Punto 2.2	0,019	1,9	0,468	46,8	0,012	1,2
Puerto "El Morro" Punto 3.1	0,021	2,1	0,513	51,3	0,025	2,5
Puerto "El Morro" Punto 3.2	0,020	2,0	0,477	47,7	0,039	3,9
Puerto "El Morro" Punto 4.1	0,016	1,6	0,380	38,0	0,028	2,8
Puerto "El Morro" Punto 4.2	0,020	2,0	0,483	48,3	0,047	4,7
Promedio	0,018	1,8	0,418	41,8	0,030	3,0

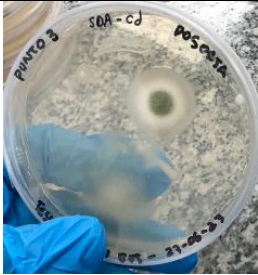



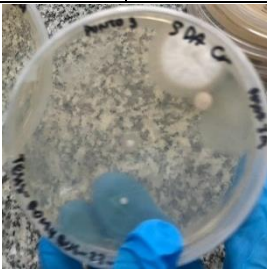

Fuente: Emily Bustamante y Kathia Romero.



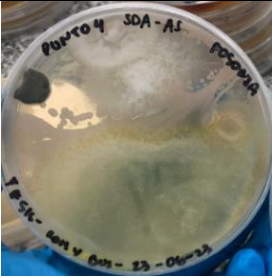

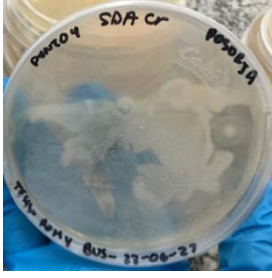
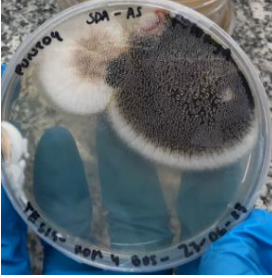
*(valor en ppm sin dilución) **(valor en ppm diluido)

Anexo 2. Diámetros de halo de crecimiento de hongos de las muestras de sedimento marino de Puerto Posorja.

Muestras Puerto Posorja	Diámetros de halo de crecimiento					
	Medio con Cd		Medio con Cr		Medio con As	
	Taxón	mm	Taxón	mm	Taxón	mm
Punto 1.1	1	40,70				
	2	30,82	1	16,05		
	3	31,49	2	17,54	1	20,84
	4	6,60	3	9,34	2	12,77
	5	8,20	3	9,34	3	11,28
	6	48,17	4	5,01		
	7	10,98				
Evidencia fotográfica						
	Taxones aislados en SDA+Cd del Punto 1.1		Taxones aislados en SDA+Cr del Punto 1.1		Taxones aislados en SDA+As del Punto 1.1	
Punto 1.2	1	82,26				
	2	35,61	1	85,28	1	20,50
	3	14,49				
Evidencia fotográfica						

	Taxones aislados en SDA+Cd del Punto 1.2		Taxones aislados en SDA+Cr del Punto 1.2		Taxones aislados en SDA+As del Punto 1.2	
Punto 2.1	1 25,80	2 10,30	1 24,63 2 25,93 3 6,54	1 3,80 2 26,47 3 17,64 4 13,08		
Evidencia fotográfica	 Taxones aislados en SDA+Cd del Punto 2.1		 Taxones aislados en SDA+Cr del Punto 2.1		 Taxones aislados en SDA+As del Punto 2.1	
Punto 2.2	1 3,84		1 13,74 2 11,30 3 18,03	1 18,08 2 37,85 3 12,38		
Evidencia fotográfica	 Taxones aislados en SDA+Cd del Punto 2.2		 Taxones aislados en SDA+Cr del Punto 2.2		 Taxones aislados en SDA+As del Punto 2.2	


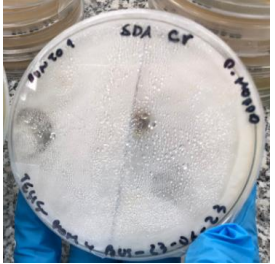




Punto 3.1	1	22,54	1	22,26	1	22,64
	2	23,20	2	16,19	2	23,74
	3	4,37	3	7,30	3	4,95
	4	6,14	4	23,16	4	2,43
Evidencia fotográfica	 <p>Taxones aislados en SDA+Cd del Punto 3.1</p>		 <p>Taxones aislados en SDA+Cr del Punto 3.1</p>		 <p>Taxones aislados en SDA+As del Punto 3.1</p>	
Punto 3.2	1	33,76	1	22,33	1	49,30
	2	19,50	2	6,36	2	42,16
			3	5,81		
			4	2,95		
			5	20,18		
Evidencia fotográfica	 <p>Taxones aislados en SDA+Cd del Punto 3.2</p>		 <p>Taxones aislados en SDA+Cr del Punto 3.2</p>		 <p>Taxones aislados en SDA+As del Punto 3.2</p>	
Punto 4.1	1	87,19	1	47,00	1	54,06
	2	4,85	2	17,65	2	17,44
			3	6,81	3	27,05
			4	6,38	4	10,90


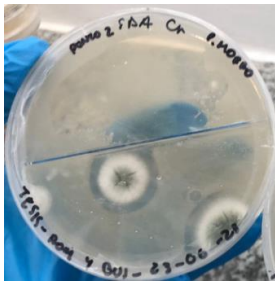

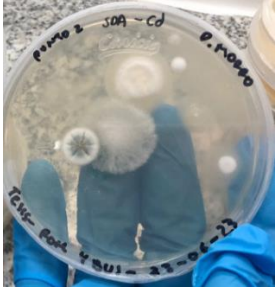

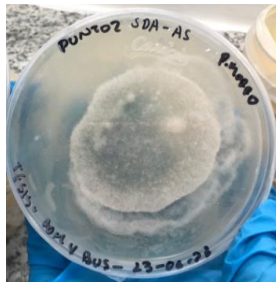
			5	1,57	5	42,28
			6	4,69		
Evidencia fotográfica		Taxones aislados en SDA+Cd del Punto 4.1		Taxones aislados en SDA+Cr del Punto 4.1		Taxones aislados en SDA+As del Punto 4.1
Punto 4.2	1 2	6,25 77,31	1 2	10,20 6,06	1 2 3 4 5	49,14 36,41 11,92 7,38 8,68
Evidencia fotográfica		Taxones aislados en SDA+Cd del Punto 4.1		Taxones aislados en SDA+Cr del Punto 4.2		Taxones aislados en SDA+As del Punto 4.2


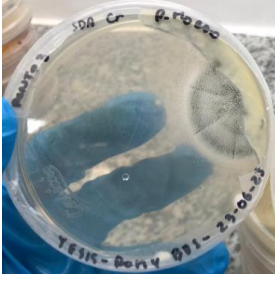

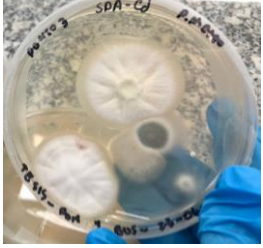

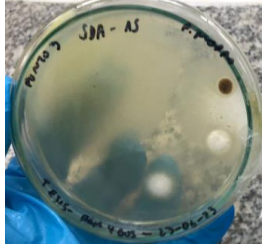
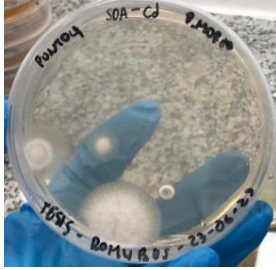


Fuente: Emily Bustamante y Kathia Romero.



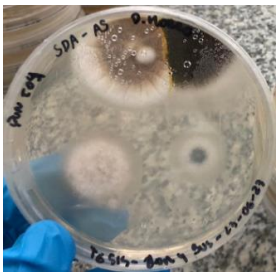
Anexo 3. Diámetros de halo de crecimiento de hongos de las muestras de sedimento marino de Puerto "El Morro".

Muestras Puerto "El Morro"	Diámetros de halo de crecimiento (mm)					
	Medio con Cd		Medio con Cr		Medio con As	
	Taxón	mm	Taxón	mm	Taxón	mm

Punto 1.1	1	37,20			1	30,72	
	2	26,35			2	25,18	
	3	14,22			3	20,45	
	4	7,46			4	20,30	
	5	19,80			5	11,93	
	6	2,64			6	10,59	
	7	4,60			7	10,85	
	8				8	10,21	
Evidencia fotográfica	 <p>Taxones aislados en SDA+Cd del Punto 1.1</p>		 <p>Taxones aislados en SDA+Cr del Punto 1.1</p>		 <p>Taxones aislados en SDA+As del Punto 1.1</p>		
	1	27,98			1	26,12	
	2	25,06			2	16,91	
3	25,27	3			12,12		
4	13,56	4			4,68		
5	9,45						
6	7,21						
7	6,73						
Evidencia fotográfica	 <p>Taxones aislados en SDA+Cd del Punto 1.2</p>				 <p>Taxones aislados en SDA+Cr del Punto 1.2</p>		 <p>Taxones aislados en SDA+As del Punto 1.2</p>
	Punto 2.1	Levadura	X	1	14,78	1	30,70
				2	15,95	2	25,03

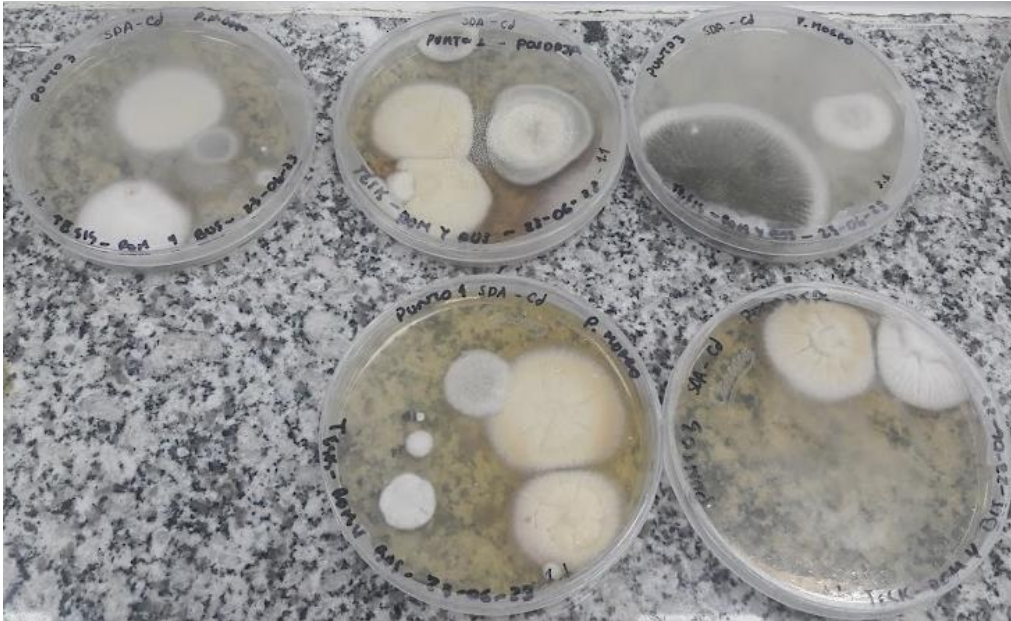
			3	23,38	3	14,64
					4	12,85
					5	8,65
					6	1,95
Evidencia fotográfica		Taxones aislados en SDA+Cd del Punto 2.1		Taxones aislados en SDA+Cr del Punto 2.1		Taxones aislados en SDA+As del Punto 2.1
Punto 2.2	1	24,44				
	2	20,70	1	15,56		
	3	11,77	2	16,52	1	68,91
	4	8,48	3	6,58		
	5	6,65	4	2,26		
	6	4,03	5	3,20		
	7	4,08				
	8	11,43				
Evidencia fotográfica		Taxones aislados en SDA+Cd del Punto 2.2		Taxones aislados en SDA+Cr del Punto 2.2		Taxones aislados en SDA+As del Punto 2.2
Punto 3.1	1	48,67	1	29,31	1	35,66
	2	26,24				
	3	17,89				

Evidencia fotográfica	 <p>Taxones aislados en SDA+Cd del Punto 3.1</p>		 <p>Taxones aislados en SDA+Cr del Punto 3.1</p>		 <p>Taxones aislados en SDA+As del Punto 3.1</p>	
Punto 3.2	<p>1</p> <p>2</p> <p>3</p> <p>4</p> <p>5</p>	<p>39,46</p> <p>34,06</p> <p>16,72</p> <p>13,54</p> <p>13,92</p>	<p>1</p> <p>2</p> <p>3</p> <p>4</p> <p>5</p>	<p>35,17</p> <p>8,79</p> <p>18,92</p> <p>8,74</p> <p>7,08</p>	<p>1</p> <p>2</p> <p>3</p> <p>4</p>	<p>52,37</p> <p>15,90</p> <p>8,37</p> <p>10,42</p>
Evidencia fotográfica	 <p>Taxones aislados en SDA+Cd del Punto 3.2</p>		 <p>Taxones aislados en SDA+Cr del Punto 3.2</p>		 <p>Taxones aislados en SDA+As del Punto 3.2</p>	
Punto 4.1	<p>1</p> <p>2</p> <p>3</p> <p>4</p> <p>5</p>	<p>23,06</p> <p>12,88</p> <p>10,49</p> <p>4,71</p> <p>2,25</p>	<p>1</p> <p>2</p> <p>3</p> <p>4</p>	<p>36,85</p> <p>24,89</p> <p>9,52</p> <p>17,31</p>	<p>1</p> <p>2</p>	<p>8,75</p> <p>2,12</p>
Evidencia fotográfica						

	Taxones aislados en SDA+Cd del Punto 4.1		Taxones aislados en SDA+Cr del Punto 4.1		Taxones aislados en SDA+As del Punto 4.1	
Punto 4.2	1 2 3 4	36,61 3,04 4,39 6,82	1 2 3 4 5	34,64 25,61 29,76 16,44 9,73	1 2 3 4	27,08 33,32 23,71 18,98
Evidencia fotográfica	 <p>Taxones aislados en SDA+Cd del Punto 4.2</p>		 <p>Taxones aislados en SDA+Cr del Punto 4.2</p>		 <p>Taxones aislados en SDA+As del Punto 4.2</p>	

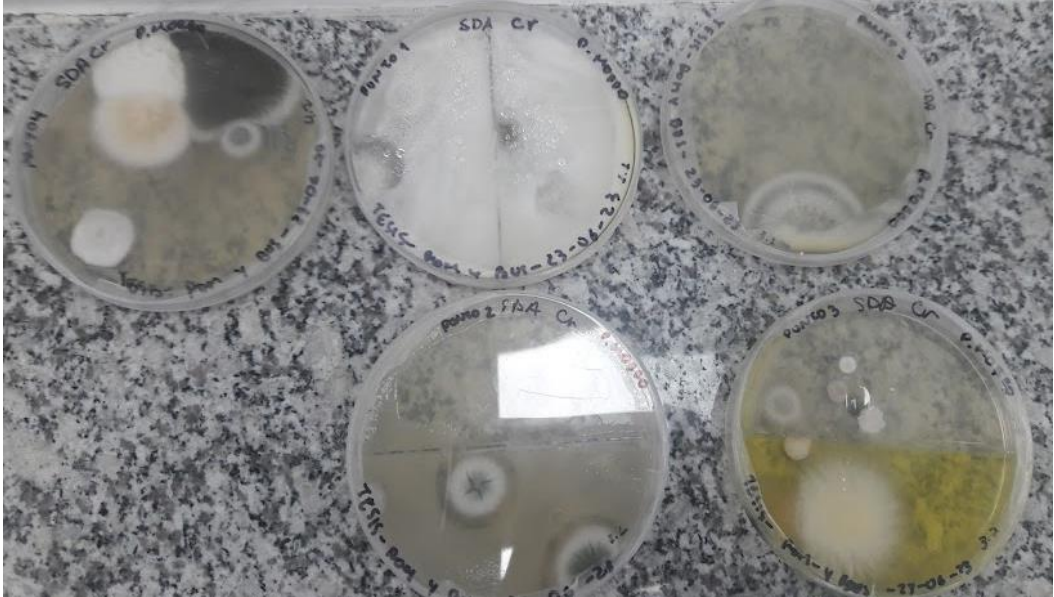
Fuente: Emily Bustamante y Kathia Romero.

Anexo 4. Muestras seleccionadas para resiembra en Cd.



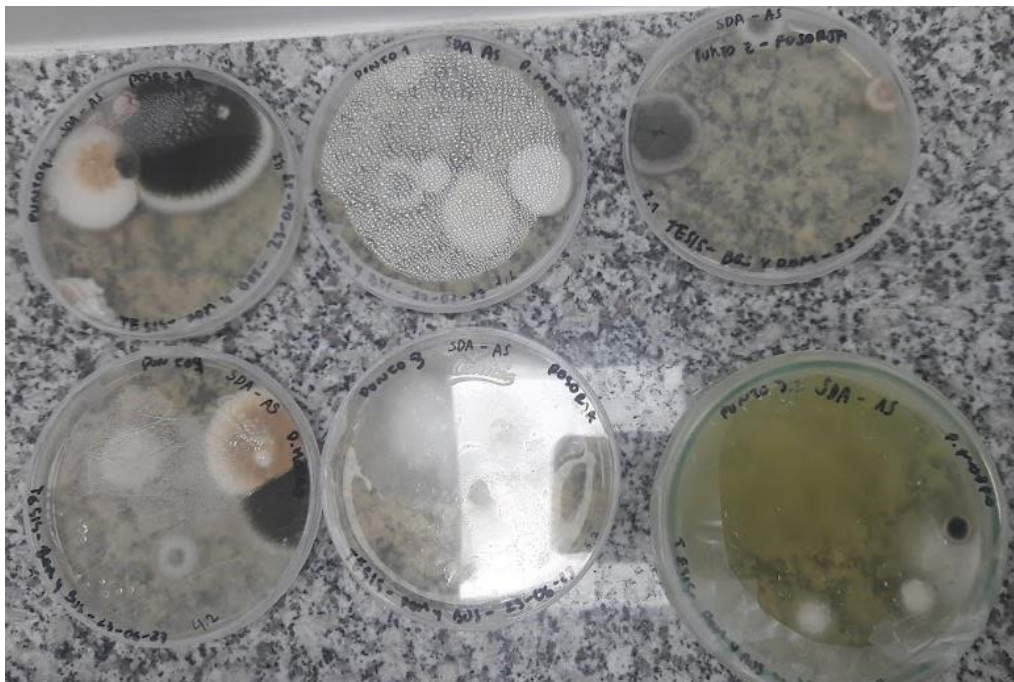
Fuente: Emily Bustamante y Kathia Romero.

Anexo 5. Muestras seleccionadas para resiembra en Cr.







Fuente: Emily Bustamante y Kathia Romero.

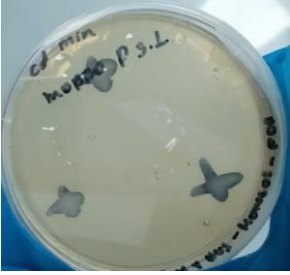






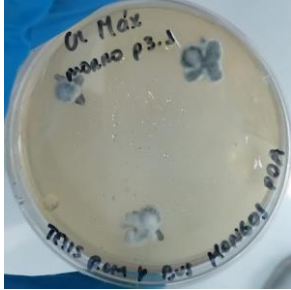

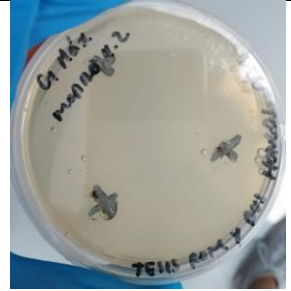


Anexo 6. Muestras seleccionadas para resiembra en As.



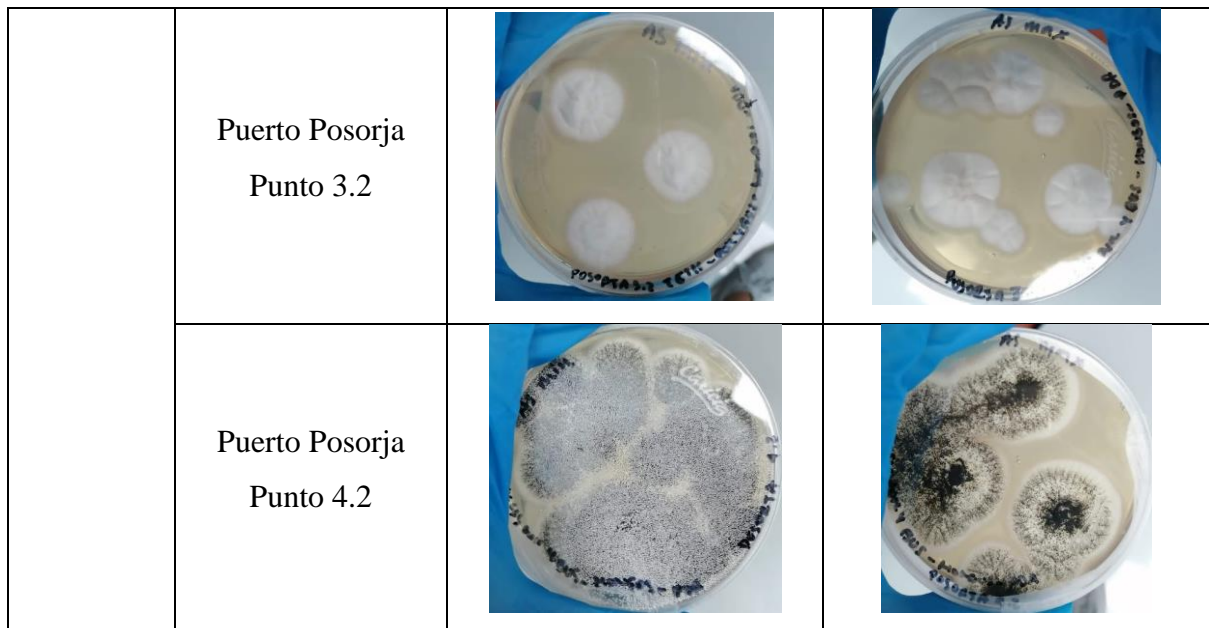
Fuente: Emily Bustamante y Kathia Romero.

Anexo 7. Aclimatación de taxones en concentraciones mínimas y máximas de metales pesados.

Metal	Descripción	Concentración mínima	Concentración máxima
Cd	Puerto "El Morro" Punto 1.1		
	Puerto Posorja Punto 1.1		

	Puerto "El Morro" Punto 3.1		
	Puerto Posorja Punto 3.2		
	Puerto "El Morro" Punto 3.2		
Cr	Puerto "El Morro" Punto 3.1		
	Puerto "El Morro" Punto 4.2		
	Puerto "El Morro" Punto 2.1		

	Puerto "El Morro" Punto 1.1		
	Puerto "El Morro" Punto 3.2		
	Puerto "El Morro" Punto 4.2		
As	Puerto "El Morro" Punto 1.1		
	Puerto Posorja Punto 2.1		
	Puerto "El Morro" Punto 3.2		



Fuente: Emily Bustamante y Kathia Romero

Anexo 8. Conteo de esporas para inoculación de hongos en tratamiento.

Cuadrante de conteo	<i>Aspergillus terreus</i>	<i>Penicillium spp.</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Cuadrante superior izquierdo	127	25	68
Cuadrante superior derecho	135	31	36
Cuadrante inferior derecho	151	36	50
Cuadrante inferior izquierdo	115	6	54
Cuadrante central	152	36	33
Promedio	136	26,8	48,2

Fuente: Emily Bustamante y Kathia Romero.

Anexo 9. Ecuación para el cálculo de las esporas.

El cálculo de las esporas en una alícuota de 1 ml de muestra fue:

$$C = \left[\left(\frac{N}{10^{-6}} \right) * FD \right] = \left[\left(\frac{136}{10^{-6}} \right) * 1 \right] = 3,4 \times 10^7 \text{ cel/ml}$$

- *Penicillium spp.:*

$$C = \left[\left(\frac{N}{10^{-6}} \right) * FD \right] = \left[\left(\frac{26,8}{10^{-6}} \right) * FD \right] = 6,7 \times 10^6 \text{ cel/ml}$$

- *Aspergillus niger:*

$$C = \left[\left(\frac{N}{10^{-6}} \right) * FD \right] = \left[\left(\frac{48,2}{10^{-6}} \right) * FD \right] = 1,205 \times 10^7 \text{ cel/ml}$$

Fuente: Emily Bustamante y Kathia Romero.

Anexo 10. Datos de concentración de metales pesados en muestras digestadas de tratamientos experimentales y de control.

Metal	Tratamiento	Concentración Día 0	Valor PPM	Concentración Día 20	Valor PPM
Cd	Máximo 3	0,074	3,7	0,019	0,95
	Máximo 3	0,070	3,5	0,014	0,7
	Control	0,076	3,8	0,076	3,8
Cr	Máximo 1	0,213	10,65	0,092	4,6
	Máximo 1	0,421	21,05	0,092	4,6
	Control	0,334	16,7	0,334	16,7
As	Máximo 2	0,062	3,1	0,056	2,8
	Máximo 2	0,063	3,15	0,057	2,85
	Control	0,071	3,55	0,071	3,55
Mix (Cd+Cr+As)	Máximo 4	0,070 (Cd) 0,411 (Cr) 0,060 (As)	3,5 20,55 3,0	0,118 (Cd) 0,412 (Cr) 0,109 (As)	5,9 20,6 5,45

	Máximo 4	0,071 (Cd)	3,55	0,106 (Cd)	5,3
		0,411 (Cr)	20,55	0,359 (Cr)	17,95
		0,061 (As)	3,05	0,096 (As)	4,8
	Control	0,072 (Cd)	3,6	0,072 (Cd)	3,6
		0,423 (Cr)	21,15	0,423 (Cr)	21,15
		0,053 (As)	2,65	0,053 (As)	2,65

Fuente: Emily Bustamante y Kathia Romero.

Anexo 11. Test de normalidad del As.

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
INICIAL	.151	4	.	.993	4	.972
FINAL	.302	4	.	.827	4	.161

a. Lilliefors Significance Correction

Fuente: Emily Bustamante y Kathia Romero.

Anexo 12. Estadística de muestras pareadas del As.

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	INICIAL	3.0750	4	.06455	.03227
	FINAL	2.9125	4	.10308	.05154

Fuente: Emily Bustamante y Kathia Romero.

Anexo 13. Test de normalidad del Cd.

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
INICIAL	.303	4	.	.791	4	.086
FINAL	.306	4	.	.767	4	.055

a. Lilliefors Significance Correction

Fuente: Emily Bustamante y Kathia Romero.

Anexo 14. Estadística de muestras pareadas del Cd.

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	INICIAL	3.5625	4	.09465	.04732
	FINAL	2.1625	4	1.54778	.77389

Fuente: Emily Bustamante y Kathia Romero.

Anexo 15. Test de normalidad del Cr.

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
INICIAL	.430	4	.	.671	4	.005
FINAL	.305	4	.	.793	4	.090

a. Lilliefors Significance Correction

Fuente: Emily Bustamante y Kathia Romero.

Anexo 16. Estadística de muestras pareadas del Cr.

Paired Samples Statistics

		Mean	N	Std. Deviation	Std. Error Mean
Pair 1	INICIAL	18.2000	4	5.03885	2.51942
	FINAL	11.0500	4	9.55885	4.77943

Fuente: Emily Bustamante y Kathia Romero.