



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**  
**SEDE GUAYAQUIL**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TRABAJO EXPERIMENTAL**

**MICORREMEDIACIÓN DE CU Y NI MEDIANTE AISLADOS MONOSPÓRICOS  
DE *FUSARIUM SP.* Y *ASPERGILLUS SP.* DE SEDIMENTOS DEL ECOSISTEMA  
DE MANGLAR EL SALADO EN LA CIUDAD DE GUAYAQUIL**

*Trabajo de titulación previo a la obtención  
del título de Ingeniera (o) en Biotecnología*

**AUTORES**

PAULINA VALERIA CASTRO PORTILLA  
JOHNNY ALEXANDER GOYA LEÓN

**TUTOR**

CARINA ELIZABETH HIDALGO RAMIREZ, MSC.

**GUAYAQUIL-ECUADOR**

2024

## CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, **Carina Elizabeth Hidalgo Ramírez** con documento de identificación N° 1722163860, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **“MICORREMEDIACIÓN DE CU Y NI MEDIANTE AISLADOS MONOSPÓRICOS DE *FUSARIUM SP.* Y *ASPERGILLUS SP.* DE SEDIMENTOS DEL ECOSISTEMA DE MANGLAR EL SALADO EN LA CIUDAD DE GUAYAQUIL”**, realizado por Paulina Valeria Castro Portilla con documento de identificación N° 0956731178 y por Johnny Alexander Goya León con documento de identificación N° 0951303924, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo Experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 29 de febrero del año 2024

Atentamente,



---

Carina Elizabeth Hidalgo Ramírez

C.I.: 1722163860

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

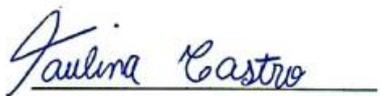
Nosotros, **Paulina Valeria Castro Portilla** con documento de identificación No. 0956731178 y **Johnny Alexander Goya León** con documento de identificación No. 0951303924, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del trabajo experimental: **“MICORREMEDIACIÓN DE CU Y NI MEDIANTE AISLADOS MONOSPÓRICOS DE *FUSARIUM SP.* Y *ASPERGILLUS SP.* DE SEDIMENTOS DEL ECOSISTEMA DE MANGLAR EL SALADO EN LA CIUDAD DE GUAYAQUIL”**, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: *Ingeniera/o 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, 29 de febrero del año 2024

Atentamente,

  
Johnny Alexander Goya León  
C.I.: 0951303924

  
Paulina Valeria Castro Portilla  
C.I.: 0956731178

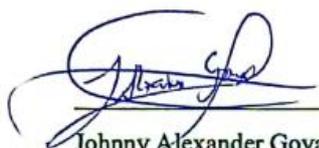
**CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE  
TITULACIÓN**

Nosotros, PAULINA VALERIA CASTRO PORTILLA con documento de identificación N° 0956731178 y JOHNNY ALEXANDER GOYA LEÓN con documento de identificación N° 0951303924; 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, 29 de febrero del año 2024

Atentamente,

  
Johnny Alexander Goya León  
C.I.: 0951303924

  
Paulina Valeria Castro Portilla  
C.I.: 0956731178

## **DEDICATORIA**

*A mi mamá, la persona más importante en mi vida.*

*Por enseñarme a que debo apreciar la luz del presente y no temer al futuro.*

*A mi papá, por siempre apoyarme en mis metas.*

*A mis hermanos, por ser mi ejemplo a seguir.*

*A mi amigo y compañero de tesis, a quien quiero mucho.*

*A mis compañeras y amigas de la universidad, gracias por estar para mí.*

**Paulina Valeria Castro Portilla**

*A mi familia y amigos.*

*A mis adoradas mascotas, Simba y Chico.*

**Johnny Alexander Goya León**

## **AGRADECIMIENTOS**

Queremos agradecer a la Universidad Politécnica Salesiana por permitirnos realizar nuestro proyecto experimental.

Agradecemos de manera especial a nuestra tutora, la MSc. Carina Hidalgo, por su apoyo incondicional, paciencia y entrega.

Agradecemos al Ing. Kevin Cedeño, por ayudarnos e instruirnos hasta culminar el proceso investigativo.

Por último, agradecemos a todos nuestros familiares y amigos más cercanos que nos han dado su apoyo incondicional en momentos difíciles.

## RESUMEN

El Estuario del Estero Salado es un ecosistema rico en flora y fauna, que hoy en día se encuentra en riesgo por la mala gestión de residuos domésticos e industriales. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue desarrollar aislamientos monospóricos de hongos con posible capacidad micorremediadora de metales pesados (Cu y Ni). La fase experimental inició con la recolección de 21 muestras de distintas zonas de ramales que conforman el ecosistema Estero Salado durante el mes de enero, de las cuales se determinó parámetros fisicoquímicos, correspondientes a pH, conductividad, contenido de humedad y la cuantificación de metales traza por medio de la tecnología ICP-OES. Una vez aisladas las cepas de *Aspergillus sp.* y *Fusarium sp.* fueron adaptadas en medios sólidos a distintas concentraciones del contaminante (5, 20 y 40) ppm, para establecer las concentraciones del tratamiento en condiciones *in vitro* de cada metal en medio PDB y Czapek Dox durante 6 días de tratamiento. Los resultados obtenidos del ICP demostraron que las concentraciones de metales de las zonas de estudio llegan hasta 232,9 ppm Cu y 50,3 ppm de Ni. Las pruebas de remoción demostraron que el género *Aspergillus* tuvo una eficiencia de 22.3% para PDB+Cu y 19.7% en PDB+Ni, sobrepasando la capacidad de remoción conseguida con el medio Czapek Dox+Cu con 12,7% y Czapek Dox+Ni 11,5% de remoción, mientras que el género *Fusarium* estudiado tuvo una eficiencia mínima en todos los aspectos, llegando a valores máximos de remoción de 5,1% en PDB+Cu y de 5,3% en PDB+Ni

**Palabras claves:** micorremediación, sedimentos, metales pesados, contaminación, hongos.

## ABSTRACT

The Estero Salado Estuary is an ecosystem rich in flora and fauna, which today is at risk due to the poor management of domestic and industrial waste. For this reason, the objective of this work was to develop monosporic fungal isolates with possible mycoremediation capacity for heavy metals (Cu and Ni). The experimental phase began with the collection of 21 samples from different areas of branches that make up the Estero Salado ecosystem during the month of January, from which physicochemical parameters were determined, corresponding to pH, conductivity, moisture content and the quantification of trace metals. through ICP-OES technology. Once the strains of *Aspergillus* sp. and *Fusarium* sp. were adapted in solid media to different concentrations of the contaminant (5, 20 and 40) ppm, to establish the treatment concentrations under *in vitro* conditions of each metal in PDB and Czapek Dox medium for 6 days of treatment. The results obtained from the ICP showed that the metal concentrations in the study areas reach up to 232.9 ppm Cu and 50.3 ppm Ni. The removal tests showed that the *Aspergillus* genus had an efficiency of 22.3% for PDB+Cu and 19.7% in PDB+Ni, exceeding the removal capacity achieved with the Czapek Dox+Cu medium with 12.7% and Czapek Dox+Ni. 11.5% removal, while the *Fusarium* genus studied had a minimum efficiency in all aspects, reaching maximum removal values of 5.1% in PDB+Cu and 5.3% in PDB+Ni

**Keywords:** mycoremediation, sediments, heavy metals, pollution, fungi.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA .....	5
RESUMEN .....	7
ÍNDICE DE TABLAS .....	11
ÍNDICE DE GRÁFICOS .....	12
ÍNDICE DE ANEXOS .....	13
Capítulo 1.....	1
Conceptualización .....	1
1.1. Introducción .....	1
1.2. Planteamiento del problema.....	2
1.3. Justificación del problema.....	3
1.4. Delimitación.....	3
1.5. Pregunta de investigación .....	4
1.6. Objetivos generales y específicos .....	4
1.6.1. Objetivo general .....	4
1.6.2. Objetivos específicos.....	4
1.7. Hipótesis.....	4
Capítulo 2.....	6
Marco teórico .....	6
2.1. Generalidades del Estero Salado .....	6
2.2. Contaminación del Estero Salado .....	7
2.4. Metales pesados.....	8
2.5. Cobre (Cu).....	8
2.6. Níquel (Ni) .....	10
2.7. Legislación y/o normativa aplicable al recurso suelo .....	11
2.8. Hongos .....	12
2.9. Biorremediación .....	12
2.10. Método de análisis de metales pesados (ICP-OES) .....	13
Capítulo 3.....	14
Materiales y métodos .....	14
3.1. Zona de estudio .....	14
Variable dependiente .....	15
Variable independiente .....	15
3.2. Análisis fisicoquímico del sedimento .....	17
3.3. Determinación de concentración de metales pesador por ICP-OES .....	17

3.4. Análisis microbiológico .....	18
3.5. Tratamientos de biorremediación de metales pesados .....	21
3.6. Análisis estadístico.....	24
Capítulo 4.....	25
Resultados y discusiones.....	25
4.1. Ubicación de zonas de muestreo .....	25
4.2. Análisis fisicoquímico de las muestras de sedimentos.....	26
4.3. Resultados en la identificación y caracterización morfológica.....	35
4.4. Resultados del análisis microbiológico .....	37
Capítulo 5.....	43
Conclusiones y recomendaciones.....	43
Conclusiones .....	43
Recomendaciones.....	44
Bibliografía.....	45
Anexos.....	52

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> <i>Representación topográfica de los puntos muestreados.</i> .....	14
<b>Tabla 2</b> Parámetros específicos para la digestión ácida de sedimentos .....	18
<b>Tabla 3.</b> Crecimiento de colonias fúngicas en concentración mínima del contaminante. ....	25
<b>Tabla 4.</b> Valores promedios de pH, conductividad y % de humedad por zonas.....	27
<b>Tabla 5.</b> <i>Promedio de concentraciones de Cobre y Níquel en muestras de sedimento procedentes del Estero Salado.</i> .....	31
<b>Tabla 6.</b> Crecimiento de colonias fúngicas sometidas a concentraciones mínimas, intermedias y altas. ....	33
<b>Tabla 7.</b> Crecimiento de colonias fúngicas sometidas a concentraciones mínimas, intermedias y altas. ....	34
<b>Tabla 8.</b> <i>Caracterización morfológica de cepas procedentes del Estero Salado.</i> .....	35
<b>Tabla 9.</b> Células por ml para inoculación .....	36

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<i>Figura 1. Esteros que recorren la ciudad de Guayaquil. ....</i>	<i>6</i>
<i>Figura 2. Desechos acumulados a lo largo de la orilla del mangle. ....</i>	<i>8</i>
<i>Figura 3. Delimitación del área de muestreo. ....</i>	<i>16</i>
<i>Figura 4. Conservación de cultivos monospóricos en glicerol al 20%. ....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 5 Esquema experimental para los tratamientos con las cepas seleccionadas. ....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 6. Sección del mapa del Ecuador que muestra la ubicación de muestreo. ....</i>	<i>25</i>
<i>Figura 7. Gráfica de variaciones de pH en las zonas de muestreo. ....</i>	<i>28</i>
<i>Figura 8. Gráfica variaciones de conductividad en las zonas de muestreo. ....</i>	<i>29</i>
<i>Figura 9. Gráfica variaciones de contenido de humedad (%) en las zonas de muestreo. ....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 10. Gráfica del promedio de muestras por zonas ....</i>	<i>32</i>
<i>Figura 11. Gráfica de comparativa de remoción en medios de 25 ppm Cu(aprox). ....</i>	<i>37</i>
<i>Figura 12 Grafica de comparativa de remoción en medios de 25 ppm Ni (aprox) ....</i>	<i>38</i>
<i>Figura 13. Gráfica de comparativa de remoción en medios de 25 ppm Cu(aprox). ....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 14. Gráfica de comparativa de remoción en medios de 25 ppm Ni (aprox). ....</i>	<i>40</i>
<i>Figura 15 Prueba de normalidad para Aspergillus en PDB+Cu día2.....</i>	<i>41</i>
<i>Figura 16 Prueba de normalidad para Aspergillus en PDB+Cu día 4.....</i>	<i>42</i>
<i>Figura 17 Prueba de normalidad para Aspergillus en PDB+Cu día 6.....</i>	<i>42</i>

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1 Escombros y desperdicios hallados cerca del Estero Salado.....</b>	<b>52</b>
<b>Anexo 2 Procesamiento de las muestras de sedimento. ....</b>	<b>52</b>
<b>Anexo 3 Criterios de remediación (valores máximos permisibles) Normativa Ambiental Ecuatoriana .....</b>	<b>52</b>
<b>Anexo 4 Criterios de calidad de suelo (valores máximos permisibles) Normativa Ambiental Canadiense.....</b>	<b>54</b>
<b>Anexo 5 Parámetros fisicoquímicos obtenidos en los puntos de muestreo. ....</b>	<b>54</b>
<b>Anexo 6 Gráfica de variaciones de pH por puntos muestreados.....</b>	<b>55</b>
<b>Anexo 7 Gráfica de variaciones de conductividad por puntos muestreados.....</b>	<b>56</b>
<b>Anexo 8 Gráfica de variaciones de contenido de humedad por puntos de muestreo. ....</b>	<b>56</b>
<b>Anexo 9 Resumen de coordenadas separadas en zonas muestreadas del Estero Salado. ....</b>	<b>56</b>
<b>Anexo 10 Parte de los crecimientos de colonias en a partir de solución madre.....</b>	<b>58</b>
<b>Anexo 11 Aislamiento de Fusarium sp. y Aspergillus sp. en medio PDA y SDA. ....</b>	<b>58</b>
<b>Anexo 12. Caracterización morfológica según fuentes bibliográficas.....</b>	<b>59</b>
<b>Anexo 13 Observación de esporas en cámara de Neubauer. ....</b>	<b>59</b>
<b>Anexo 14 Curvas de calibración Cobre y Níquel de ICP-OES.....</b>	<b>60</b>
<b>Anexo 15. Concentraciones generales de Cobre y Níquel en muestras de sedimento procedentes del Estero Salado. ....</b>	<b>60</b>
<b>Anexo 16 Gráfica de concentraciones generales de metales pesados en los sedimentos del Estero Salado.....</b>	<b>61</b>
<b>Anexo 17 Valores de lectura de metales en suelo (Cu y Ni) en ICP-OES.....</b>	<b>61</b>

# Capítulo 1

## Conceptualización

### 1.1. Introducción

El aprovechamiento de los recursos naturales cuenta con una larga historia, aunque desde un principio, ocurre sin pensar en las consecuencias que dejan atrás ciertas prácticas, como la minería (Rodríguez, 2017). En el tiempo actual, se puede decir que casi todas las actividades industriales requieren de la participación de la metalurgia o del reciclaje de los materiales, dado que muchos componentes de los equipos usados en distintas áreas contienen metales ya sea oro, hierro, cadmio, plomo, mercurio, cobre, níquel, entre otros (Sepúlveda et al., 2005).

Los metales pesados, considerados contaminantes, tienen una alta capacidad tóxica hacia el medio ambiente y llegan afectar a las personas que habitan en los alrededores en el caso de áreas pobladas (Londoño Franco et al., 2016). La exposición directa o inclusive indirecta a este tipo de compuestos hallados en sedimentos puede causar en seres humanos, según comentan Pabón et al., (2020) “erupciones cutáneas, malestar de estómago y úlceras, problemas respiratorios, debilitamiento del sistema inmune, daño en los riñones e hígado, cáncer de pulmón, afecciones cardíacas, óseas, testiculares y del sistema nervioso central y periférico o la muerte”.

Según la Norma Técnica Ambiental Ecuatoriana descrita en parte por la ministra del Ambiente (Tapia Núñez, 2015), el valor máximo permitido de cobre (mg/kg) en suelo es de “63” (zonas residenciales) y de “91” (zonas industriales), del mismo modo, la concentración máxima permisible de níquel (zonas residenciales e industriales) es de “100” y “50“(mg/kg) de manera respectiva.

Debido a eso existen varias formas de remoción de metales pesados, tanto de efluentes como de suelos con un alto contenido de desechos tóxicos. Una de estas técnicas de eliminación es por procesos fisicoquímicos, los mismos que llegan a tener un costo elevado y aun así pueden ser ineficientes a la hora de disminuir la concentración de contaminantes en el suelo (Mejía, 2006).

La bio recuperación de metales pesados es un área que causa un gran interés por ser, menos agresiva con el medio ambiente. Puede cubrir extensas áreas y disminuye en mayor medida, el riesgo del personal al movilizar el material contaminado, por su aplicación *in situ* (González, 2005).

Las técnicas biotecnológicas resultan ser una alternativa más económica y amigable, de modo que los ecosistemas sufren el menor daño posible al ser intervenidos. Estos métodos de remediación usan bacterias, hongos o plantas nativas de la zona para lograr un alto porcentaje de remoción del contaminante (Pernía et al., 2019).

## **1.2. Planteamiento del problema**

La contaminación ambiental provocada por la presencia de compuestos tóxicos hace que ocurra un desequilibrio biológico en los ecosistemas a nivel global, convirtiéndose en un foco de preocupación, debido a que los metales pesados pueden ser tóxicos para las plantas, los animales e incluso en humanos, lo que causa varias consecuencias en la salud (Fu & Xi, 2020).

Uno de los mayores problemas a los que se enfrenta el ecosistema de manglar El Estero Salado es en su mayoría el manejo deficiente de los desechos con cargas de metales pesados, los cuales al no ser tratados de manera adecuada son propensos a la bioacumulación como consecuencia de la microbiota nativa en efluentes o suelos, lo que causa desbalance e intoxicación de los mismos ya que acumulan con el tiempo concentraciones por encima de los límites permisibles (Coello, 2011).

### **1.3. Justificación del problema**

Los ecosistemas de manglar del Estero Salado son conocidos por atravesar zonas residenciales, industriales y turísticas con una gestión deficiente de residuos que provoca una elevada acumulación de contaminantes peligrosos en sus aguas y sedimentos (Vélez, 2015).

Una estrategia viable para el saneamiento por biosorción de áreas contaminadas es la micorremediación, la cual conlleva el uso de hongos que degradan metales pesados, debido a su habilidad para desarrollarse por medio de hifas que penetran en sustratos para acceder de manera directa a fuentes de nutrientes lo que metaboliza sustancias no degradables (Pernía, Rojas-Tortolero, et al., 2018).

En la presente investigación se pretende implementar procesos de micorremediación de metales pesados con el uso cepas de *Fusarium sp.* y *Aspergillus sp.* aisladas de una zona contaminada en el ecosistema de manglar Estero Salado en la ciudad de Guayaquil, junto con el aislamiento de microorganismos tolerantes y degradadores de cobre y níquel.

### **1.4. Delimitación**

Para la determinación de metales pesados en sedimentos del manglar Estero Salado se delimitará el área de muestreo en varias zonas a nivel de la Avenida Barcelona, Miraflores, Parque Lineal Kennedy, Puente ecológico y Urdesa de la ciudad de Guayaquil.

La investigación estará enfocada en el aislamiento de colonias fúngicas con capacidad micorremediadora de metales pesados, cobre y níquel. La concentración de metales pesados será determinada por medio del equipo de Espectrometría de Emisión Atómica de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-OES) y se determinará la efectividad de los cultivos monospóricos en tratamientos *in vitro* con los contaminantes.

## **1.5. Pregunta de investigación**

¿Las cepas de *Fusarium sp.* y *Aspergillus sp.* aisladas del ecosistema de manglar Estero Salado tienen capacidad micorremediadora de metales pesados, Cu y Ni?

## **1.6. Objetivos generales y específicos**

### ***1.6.1. Objetivo general***

Evaluar la actividad micorremediadora de Cu y Ni utilizando cepas de *Fusarium sp.* y *Aspergillus sp.* aisladas de sedimentos del ecosistema de manglar El Salado en la ciudad de Guayaquil.

### ***1.6.2. Objetivos específicos***

- Desarrollar cultivos monospóricos de *Fusarium sp.* y *Aspergillus sp.* mediante técnicas de aislamiento y resiembra sucesiva en medios de cultivo específicos.
- Evaluar las cepas de hongos con mejor adaptabilidad al contaminante mediante la inoculación en medios sólidos formulados a diferentes concentraciones.
- Determinar la remoción de metales (Cu y Ni) mediante espectrometría de emisión óptica de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES) por parte de las cepas fúngicas sometidas a condiciones nutricionales distintas bajo una misma concentración de metal en un tiempo determinado.

## **1.7. Hipótesis**

**H0:** Los hongos aislados del ecosistema de manglar Estero Salado tienen capacidad micorremediadora frente a metales pesados en condiciones *in vitro* (Cu y Ni).

**H1:** Los hongos aislados del ecosistema de manglar Estero Salado no tienen capacidad micorremediadora frente a metales pesados en condiciones *in vitro* (Cu y Ni).

## Capítulo 2

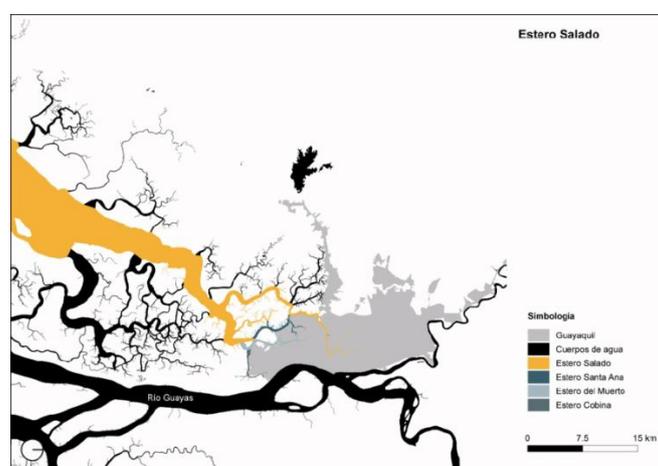
### Marco teórico

#### 2.1. Generalidades del Estero Salado

El Estero Salado es un ecosistema que alberga una amplia variedad de vida marina. El cual está conformado por brazos de mar cuyas aguas se entremezclan con el río Guayas, y se extiende desde el Golfo hasta la ciudad de Guayaquil (Calero, 2010). Presenta un recorrido de más de 50 km, estos ecosistemas estuarios concentran el 81% de los ecosistemas de manglar en el Ecuador y brindan una inmensa variedad de bienes y servicios que son indispensables para la supervivencia de comunidades aledañas dedicadas a la pesca o el comercio de crustáceos (Monserrate et al., 2009).

Como lo menciona Rojas Mosquera & Rojas Criollo (2019) el Estero Salado se divide en varias ramificaciones, el Estero Cobina, el Estero del muerto, el Estero Santa Ana y el Estero Salado, estas cuatro ramificaciones han sido un factor importante en la configuración de los límites naturales de la ciudad hacia el suroeste, por lo que hoy en día se pueden observar varios ramales más pequeños que se adentran al centro de la ciudad.

*Figura 1. Esteros que recorren la ciudad de Guayaquil.*



**Obtenido de:** (Rojas Mosquera & Rojas Criollo, 2019b)

## **2.2. Contaminación del Estero Salado**

El ecosistema de mangle atraviesa problemas severos de contaminación, puesto que se ha convertido en un vertedero de desechos industriales y domésticos, que también es contaminado por el depósito de cargas orgánicas (Pernía, Mero, et al., 2018). La insalubridad y las condiciones en las que se encuentra el ecosistema trae consigo problemas de salud pública a las personas (Torres & Palacios, 2007).

Según una publicación realizada por el Ministerio del Ambiente, (2012), existe un total de 190 industrias que liberan cargas orgánicas en varias zonas del Estero Salado, como ejemplos tenemos la liberación de insumos agrícolas, fabricación de productos plásticos, incluso textiles son unas de las responsables de la contaminación que llega a sus aguas y riveras.

## **2.3. Situación actual del Estero Salado**

Las perturbaciones antropogénicas que ocurren en la urbe que rodea al Estero Salado han afectado en gran medida, la situación actual del manglar, debido la deforestación, la construcción de viviendas ilegales, la pesca indiscriminada y el vertido de aguas residuales e industriales ((Poveda & Avilés, 2018)

Este último, genera un incremento en los límites permisibles de contaminación por metales pesados, puesto que varias empresas nacionales no realizan seguimiento a sus efluentes (Fernández-Cadena et al., 2014).

Se han establecido focos de contaminación como la zona cercana al puente Miraflores, Urdesa, Perimetral, Isla trinitaria y en el río Guayas en el área del puerto Marítimo, ya que son zonas que se han evaluado antes y se ha registrado una evidente contaminación de hidrocarburos, metales pesados y microorganismos patógenos (Baños, 2012; Vargas, 2015). Sin embargo, no existe suficiente información sobre tratamientos biológicos o alternativas orientadas a la recuperación de las áreas afectadas.

*Figura 2. Desechos acumulados a lo largo de la orilla del mangle.*



**Elaborado por:** Los autores (2024)

#### **2.4. Metales pesados**

Los metales pesados son un grupo de elementos químicos de alta densidad, los cuales pueden ser removidos de yacimientos mineros para la fabricación de acero inoxidable, monedas, joyas o aparatos electrodomésticos (Rodríguez, 2017). No obstante, es un material no biodegradable que puede provocar efectos nocivos para el medio ambiente y para el ser humano por su carácter acumulativo (Sánchez et al., 2022).

Estos componentes también pueden encontrarse de forma natural en la corteza terrestre y son imprescindibles para el sistema bioquímico de los seres vivos, como el hierro, magnesio, zinc o el cobre, los cuales aseguran el correcto funcionamiento del cuerpo (Hamai et al., 2024).

## **2.5. Cobre (Cu)**

### **2.5.1. Propiedades químicas**

El cobre es un metal de transición, su número atómico es 29, el peso es de 63.55 g/mol, punto de fusión 1083°C y punto de ebullición 2595°C (Helmestine, 2021). Una de las características más relevantes del cobre es su excelente conductividad eléctrica, esto lo convierte en un material ideal para aplicaciones en las que se requiere una transmisión eficiente de corriente eléctrica (Londoño Franco et al., 2016). Es un elemento estable, debido a que posee una larga durabilidad y destaca por su resistencia al fuego, cambios de presión, temperatura y agentes externos (Ceballos, 2020).

### **2.5.2. Toxicología del cobre**

El exceso de cobre puede provocar repercusiones en salud de las personas, lo cual genera malestar estomacal, diarrea o náuseas, síntomas que pueden ser eliminados al momento en que se deja de consumir el metal (Mahurpawar, 2015).

Los iones de cobre libre pueden causar daños en los componentes celulares, induce el estrés oxidativo, esto genera un problema inminente junto a las enfermedades propias del envejecimiento, como Alzheimer, arterosclerosis, diabetes mellitus y otras afecciones que se deben el exceso de este elemento en la ingesta diaria (Brewer, 2010). Además, causa daño en el ADN y reduce la proliferación celular (Royer & Sharman, 2024). La presencia de cobre en suelos puede provocar disminución de fertilidad, riesgo de eliminar la biomasa y pérdida de actividad metabólica de los microorganismos (Altimira, 2010).

### **2.5.3. Fuentes y usos del cobre**

El cobre es el oligoelemento más abundante que se encuentra en cerebro, hígado y en riñones. Los excesos a menudo están relacionados con materia prima industrial común, combustibles fósiles, basurales y producción de madera (Li et al., 2023).

El cobre es utilizado en la fabricación de cables eléctricos, motores, generadores, paneles eléctricos, maquinarias, medios de transporte, vehículos espaciales, también se usan en pesticidas en agricultura convencional y orgánica (Žvab et al., 2021). Con respecto al área de la salud, el cobre es un elemento que permite cumplir funciones vitales, como la producción de energía, tejido conectivo y vasos sanguíneos. El cobre fortalece el sistema inmunológico, previene enfermedades como la anemia, dado que facilita el transporte de hierro en el flujo sanguíneo (Victorava & Feoktistova, 2018).

## **2.6. Níquel (Ni)**

### **2.6.1. Propiedades químicas**

El níquel es un metal de transición de color blanco plateado con tonos amarillentos, funciona como un conductor de electricidad, calor y como material para fabricar monedas o joyas, ya que puede formar aleaciones junto con otros metales (Denkhaus & Salnikow, 2002). Es un oligoelemento esencial en plantas y en ciertas especies de animales que puede ser hallado con facilidad en el aire, suelo, sedimentos, agua potable e incluso en partículas de polvo (Gad, 2024).

### **2.6.2. Toxicología del níquel**

La absorción de níquel puede inducir una serie de patologías que perjudican al ser humano, por ser considerado un elemento tóxico al momento de ingerirse en elevadas cantidades (Guo et al., 2020). Existe una mayor posibilidad de desarrollar cáncer de pulmón, cáncer de nariz, cáncer de laringe, cáncer de próstata y mareos (Mahurpawar, 2015b).

En la actualidad, hay pocos estudios que indiquen que su exposición aumenta el riesgo de nuevas formas cancerígenas. Los efectos iniciales al inhalar este compuesto implican irritación en el tracto respiratorio, alta prevalencia de dermatitis alérgica, anomalías cardíacas y fallos respiratorios (Barceloux & Barceloux, 1999).

### **2.6.3. Fuentes y usos del níquel**

En un estudio elaborado por Díaz y colaboradores (2001) indicaba que el níquel puede estar presente en fuentes de aguas residuales y en lodos que se aplican al suelo como un tipo de fertilizante en los cultivos. Por lo que es un metal pesado, que puede contaminar áreas agrícolas.

Otra fuente principal es la actividad antropogénica provocada por la combustión del carbón, petróleo y combustibles fósiles. En algunos países se han encontrado altas concentraciones de níquel en moluscos, crustáceos como el cangrejo rojo, líquenes, hongos, peces y plantas que pueden acumularlo (Olivares Arias et al., 2015).

Es utilizado en la fabricación de materiales quirúrgicos, electrodomésticos, cubiertos, fregaderos o equipos marinos por su capacidad para formar acero inoxidable, también se emplea como protector de metales que tienden a ser frágiles y en la producción de baterías de níquel- cadmio (Ahmad & Ashraf, 2012).

### **2.7. Legislación y/o normativa aplicable al recurso suelo**

Según la Normativa Ambiental Ecuatoriana, acuerdo ministerial No. 028 (Tapia Núñez, 2015) se detallan en el Anexo 3 los valores máximos permisibles de metales pesados en suelos de acuerdo con su uso. Así mismo, se detallan en los anexos 3 y 4 las especificaciones de estos, y también los valores según el Canadian Council of Ministers of the Environment (2015).

## **2.8. Hongos**

Los hongos son eucariotas con un nivel de complejidad biológica más elevado que las bacterias, poseen esporas su reproducción, almacenan glucógeno y en su estructura interna contienen quitina, asociada a polisacáridos (Cubas, 2007).

Los hongos son esenciales para los procesos de remoción, puesto que “se encargan de segregar enzimas que rompen y separan enlaces de compuestos grandes que eliminan átomos como los halógenos y rompen enlaces de hidrógeno y carbono” (Bharath et al., 2019). Por medio de mecanismos de biosorción, bioacumulación y biotransformación pueden remover compuestos orgánicos, pesticidas o metales pesados (Mohamadhasani & Rahimi, 2022).

## **2.9. Biorremediación**

La biorremediación consiste en una técnica que utiliza sistemas biológicos como plantas, microorganismos o ambos para generar productos que secuestren sustancias tóxicas, para abordar la contaminación de suelos, aire y agua (Crawford & Rosenberg, 2013). La eliminación de los contaminantes también depende de la naturaleza de este, como pueden ser agroquímicos, hidrocarburos, gases de efecto invernadero, metales o plásticos (Sharma & Shukla, 2022).

### **2.9.1. Micorremediación**

La micorremediación se caracteriza por “el uso de cepas fúngicas y setas (el cuerpo fructífero de los hongos) para la eliminación de desechos del medio ambiente” (Chávez et al., 2013). Los hongos se centran en tratar contaminantes orgánicos e inorgánicos y presentan la particularidad de poder crecer en condiciones extremas, ya que usa como fuente de nutrientes a sustancias tóxicas y transformándolas en formas más simples (Bhandari, 2017). En algunos casos, para optimizar este tipo de procesos, es necesario agregar fuentes de nitrógeno, fósforo y oxígeno para estimular la actividad biológica (Crawford & Rosenberg, 2013).

### **2.9.2. Mecanismos de la micorremediación**

Según lo mencionado por Singh et al., (2018) en su libro recopilatorio sobre “La micorremediación y sustentabilidad ambiental”, la micorremediación es una estrategia de remediación sin repercusiones fuertes en el ambiente, ya que es considerada de las más seguras para la conversión de contaminantes.

Existen varios mecanismos en los que las especies fúngicas se encargan de la biorremediación de metales, estos incluyen, la bioacumulación en donde se ejecutan procesos de remoción de metales con el uso de células vivas con dependencia de energía para favorecer el ingreso de metales (Nuñez et al., 2023). Otro mecanismo denominado biosorción consiste en una reacción fisicoquímica que involucra la toma de toxinas por fuentes biológicas muertas y/o inactivas por medio de mecanismos como la adsorción, quelación, entre otros, por último, la biodegradación (Bhandari, 2017).

### **2.10. Método de análisis de metales pesados (ICP-OES)**

La espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) es una técnica usada a nivel mundial para poder determinar y cuantificar la mayoría de los elementos de la tabla periódica a nivel traza, entre ellos metales pesados presentes en muestras de suelo, agua y plantas (Jiménez Heinert et al., 2020)

Esta técnica es también utilizada por el sector industrial al momento de analizar elementos tóxicos presentes en muestras ambientales, donde, a partir del ingreso de la muestra líquida, la misma es transportada por medio de una bomba peristáltica hasta el nebulizador donde se transforma en aerosol por acción del gas argón a la antorcha del ICP-OES (Khan et al., 2022).

## Capítulo 3

### Materiales y métodos

#### 3.1. Zona de estudio

Las 21 estaciones de muestreo, ubicadas todas en las orillas de diferentes zonas del Estero Salado, enfocándonos en los ramales A y B, donde por medio de una aplicación GPS, se establecieron las coordenadas, las cuales se encuentran señaladas en la Tabla 1.

*Tabla 1. Representación topográfica de los puntos muestreados.*

Zona 1	Zona 2
	
Zona 3	Zona 4



Elaborado por: (Los autores, 2024)

### 3.1.2. Variables

#### *Variable dependiente*

La variable independiente estará determinada por la condición nutricional a la que se someten los microorganismos

#### *Variable independiente*

La variable dependiente correspondió al metabolismo de los hongos con respecto a capacidad biorremediadora.

### 3.1.3. Procedimiento de recolección de muestras de sedimentos

Se determinaron 4 zonas puntuales para la recolección de sedimentos según estudios realizados antes en los sectores con mayor índice de interferencia antropogénica. Se hizo un muestreo estratificado, que abarcó los ramales del Estero Salado y seleccionándose 21 puntos específicos.

En enero del 2024, en el inicio de la época lluviosa, se recolectaron las muestras. Mediante la aplicación UTM Geo Map, los puntos de muestreo fueron georreferenciados y marcados a una distancia de 250- 300 metros entre ellos (Guarco, 2015).

El área de muestreo fue delimitada a 1 m<sup>2</sup> y se dividió en 4 partes. Para la recolección se utilizaron tubos de PVC, introduciéndolos a una profundidad de entre 0 a 30 cm de la capa superficial y se tomó cerca de 1 kg de la muestra en la línea de marea baja almacenadas en fundas herméticas. Luego se procedió a etiquetar los datos necesarios para su identificación y fueron conservadas en hieleras a 4°C (Guarco, 2015).

*Figura 3. Delimitación del área de muestreo.*



**Elaborado por:** Los autores (2024)

### **3.2. Análisis fisicoquímico del sedimento**

- **pH**

Según el método 9045 del manual EPA SW-846 se pesaron 20 gramos de la muestra, se diluyó en 20 ml de agua destilada, se agitó por 10 minutos, en el agitador magnético y se dejó reposar por 1 hora. Se calibró el equipo METTLER TOLEDO, modelo SevenCompact pH Meter S220, antes de realizar la lectura para obtener resultados precisos, de acuerdo con las indicaciones del manual.

- **Conductividad**

Según la guía para análisis de suelos elaborada por Andrades et al. (2015) se preparó una solución con 10 gramos de sedimento y se añadió 50 ml de agua desionizada, la cual se homogenizó durante 5 minutos por agitación magnética, la solución fue filtrada y se tomó la medida de conductividad con el equipo multiparámetro OAKTON PCTS 50.

- **Humedad**

Se utilizó el analizador de humedad OHAUS – MB23, con la adición de 1 gramo de muestras de sedimentos sobre un platillo de aluminio a una temperatura de 115 °C. El tiempo de lectura cada muestra varió entre 30 y 60 minutos.

### **3.3. Determinación de concentración de metales pesados por ICP-OES**

#### **3.3.1. Preparación previa a la digestión ácida**

Las muestras se colocaron en recipientes estériles y se secaron en la estufa a 100 °C por 3 días, para eliminar su contenido de humedad, se trituró de forma manual con un mortero de porcelana, para desintegrar las partículas aglomeradas y luego fueron tamizadas con ayuda de un tamiz (fracción <250 µm) para evitar la presencia de residuos de mayor tamaño (Barzallo et al., 2021).

### 3.3.2. Digestión ácida bajo la normativa EPA 3051

Como primer paso, el material utilizado para la digestión fue desinfectado con una solución de Extran, se enjuago con agua potable, etanol al 96% y se lavó con abundante agua tipo 1. La digestión se realizó, de acuerdo con la normativa EPA 3051, (2018) mediante el equipo CEM MARS 6, para la cual se pesaron 0.5 gramos de la muestra seca y pulverizada en la balanza analítica, se trasladaron las muestras a los recipientes digestores, se adicionó 10 ml de ácido nítrico concentrado, se agitó el contenido y se dejó reposar por 15 minutos antes de cerrar los recipientes, para finalizar, las condiciones del equipo se configuraron según la normativa, como se describe en la Tabla 3.

*Tabla 2 Parámetros específicos para la digestión ácida de sedimentos*

<b>Programa de calefacción</b>						
<b>Etapa</b>	<b>Temp (°C)</b>	<b>Ramp (mm:ss)</b>	<b>Retención (mm:ss)</b>	<b>Presión (psi)</b>	<b>Potencia (W)</b>	<b>Agitación</b>
1	175	5:30	4:30	800	900-1800	Apagado

**Obtenido de:** (CEM MARS 6 Method Note Compendium, 2018), información recopilada por

Los autores (2024).

Una vez culminó el proceso de digestión, se dejó enfriar los envases y se filtró el contenido con papel filtro grado cuantitativo, se procedió a aforar con 50 ml de ácido nítrico al 2% y se conservó en envases a una temperatura de 4°C (EPA 3051, 2018).

### 3.4. Análisis microbiológico

Las muestras recolectadas se llevaron el mismo día al laboratorio de microbiología para empezar con el proceso de siembra de los microorganismos para su consiguiente aislamiento.

#### 3.4.1. Diluciones para siembra

Se utilizó la técnica de diluciones modificada de Valenzuela et al. (2006), en donde se pesaron 100 g de suelo y se colocaron en un frasco boeco con 900 mL de agua destilada estéril, se agitó la mezcla por 10 minutos a 1500 r.p.m., y vertió 1 mL de la disolución madre sobre el medio SDA suplementado con 0.5 ppm de Cu y Ni, las placas fueron incubadas por 5 días a 28 °C y se verificó el crecimiento de los hongos adaptados a bajas concentraciones de contaminante para seleccionar aquellas con mejor adaptabilidad.

#### **3.4.2. Resiembra y purificación de taxas fúngicas**

Para determinar la capacidad de resistencia al estrés por metales pesados, las cepas fúngicas aisladas fueron sembradas en medio SDA + cloranfenicol, suplementados con Cu y Ni a concentraciones bajas, medias y altas que corresponden a valores de 5, 20 y 40 ppm, luego fueron incubadas por 7 días a 28°C. De esta forma, se seleccionaron las colonias aplicables para el tratamiento *in vitro*.

#### **3.4.3. Resiembra sucesiva para selección definitiva**

Para la resiembra de los hongos filamentosos se usó una metodología modificada, debido a las condiciones en las que se realizó el trabajo, de Savitha et al. (2022) y toma de esporas por punción. el cual indica una forma de resiembra para cepas fúngicas. En este caso se usó materiales que difieren del protocolo original.

#### **3.4.4. Procedimiento de identificación taxonómica de las colonias fúngicas**

Se prepararon los medios PDA y SDA, para el subcultivo de los hongos con mayor tolerancia a los contaminantes. Y se llevó a la incubadora por 7 días a 28 °C (Luna et al., 2010; Hernández et al., 2019).

Los criterios que se utilizaron para la identificación de los hongos fueron la observación macroscópica y microscópica de las colonias, fue basado en la metodología de

Valenzuela et al., (2006), la cual señala que, para determinar la morfología, se utilizó el estereoscopio Motic Swift Line Dual para evaluar la apariencia, consistencia, color y forma de crecimiento del cultivo.

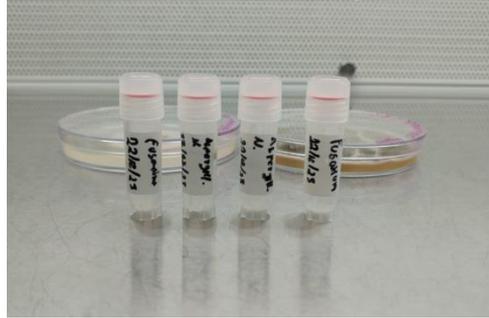
Las características microscópicas fueron visualizadas al realizar una impronta del cultivo a la que se le agregó una gota de azul de lactofenol en un portaobjetos y se tomó un trozo cinta adhesiva con el lado pegante sobre el micelio aéreo de acuerdo a la metodología descrita por Esaú López-Jácome et al., (2014); de esta forma observó bajo el microscopio las características morfológicas del micelio, el tipo de hifas y los órganos reproductivos con aumento de 40X y 100X.

En el proceso de identificación se implementaron distintos autores de entre los que se citan: Illustrated Genera of Imperfect Fungi (Barnett & Hunter, 1986), Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi (Watanabe, 2010), Micología Médica Ilustrada (Arenas, 2003 y Introductory mycology (Alexopoulos et al., 1996).

#### **3.4.5. Procedimiento para preservación de colonias fúngicas**

La metodología de preservación de las colonias se realizó a través del protocolo establecido por Kaur et al. (2011) en donde, se esterilizó los viales en autoclave junto con la solución de glicerol al 20%, posterior se colocó 1 ml de glicerol en cada uno de los tubos y se realizaron cortes en el medio que contenían las taxas de interés, se almacenaron en el refrigerador a  $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Figura 4.** *Conservación de cultivos monospóricos en glicerol al 20%.*



**Elaborado por:** Los autores (2024)

### **3.5. Tratamientos de biorremediación de metales pesados**

#### **3.5.1. Conteo de esporas**

Para la suspensión de esporas se tomó en cuenta la metodología de (Triana, 2016) se preparó tween 80 al 0.1%, para obtener 20 ml de la solución en donde se inocularon las cepas fúngicas, por medio de una jeringa se realizó un raspado de la superficie y las esporas se transfirieron a los tubos de ensayo, para luego agitar en el equipo Analog Vortex Mixer por 5 minutos, para la cuantificación de esporas.

Se colocó 30  $\mu$ L de la solución en la Cámara de Neubauer, junto con el cubreobjetos.

El conteo de esporas de los hongos fue realizado por cuadrantes con una medición de 0.1 mm de profundidad y cinco cuadrantes que correspondieron 0.2 mm, para llevar a cabo el conteo, se tomaron en cuenta las esporas más definidas por cada cuadrante (Herrera et al., 2022).

Se utilizó el microscopio binocular BOECO Modelo BM-120 en el objetivo 10X y luego se hizo el cambio al objetivo 40X para determinar el campo de lectura, por último, se obtuvo el número de esporas por mL y el número de esporas totales con el uso la siguiente formula:

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{mL}} = \text{No. esporas contadas} \times 25,000 \times \text{Factor de dilución}$$

Este cálculo estimó la cantidad de células/mL, después, el resultado obtenido se multiplico por el volumen de la suspensión original para determinar el total de esporas.

### **3.5.2. Preparación de medios experimentales adicionados con Cu y Ni**

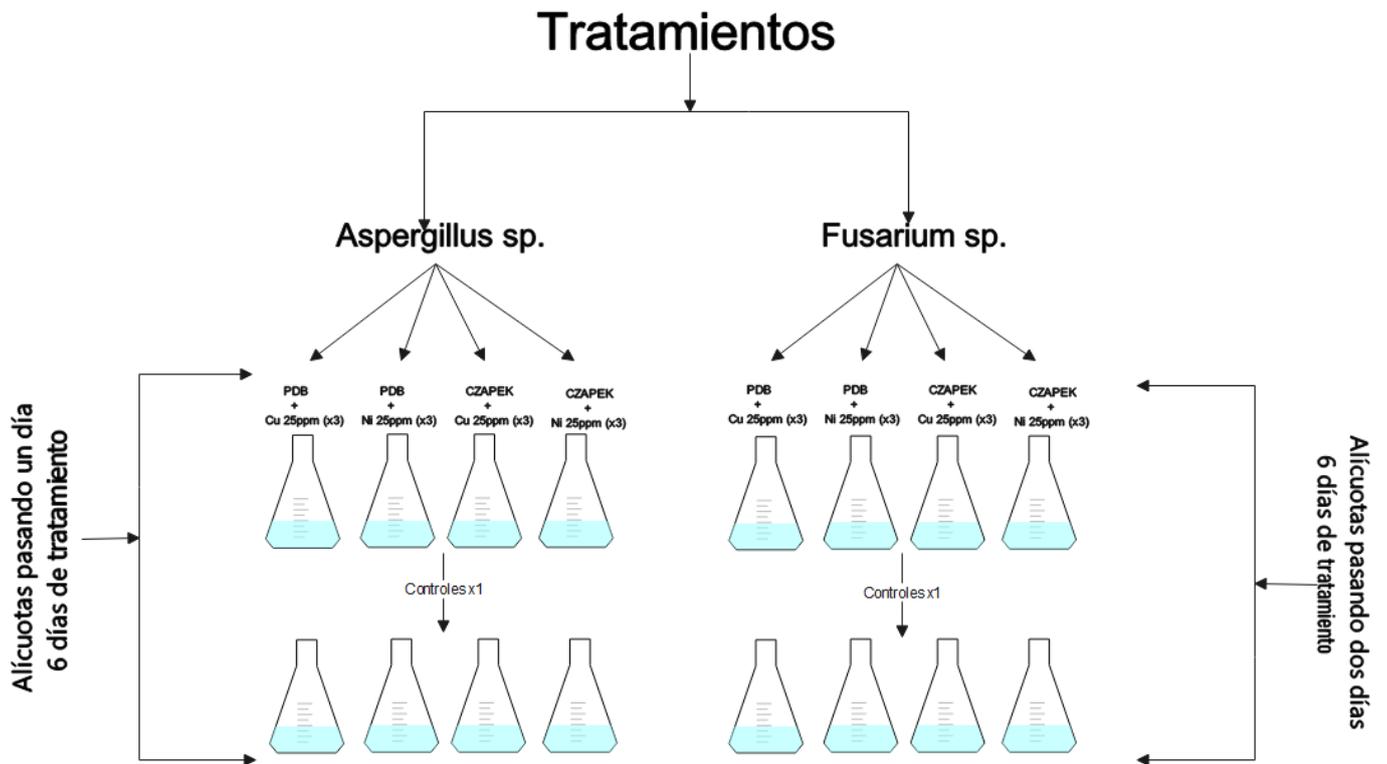
Los medios de cultivo establecidos para el tratamiento fue caldo PDA (20 g dextrosa + 4 g almidón de papa) y medio Czapek Dox modificado (Sacarosa 30 g + sulfato de potasio 0.35 g + sulfato ferroso 0.01 + cloruro potásico 0.5 g + nitrato de potasio + cloruro de sodio 0.25 g + sulfato de magnesio 0.5) al cual se le realizó el ajuste de pH a 5,6 con HCl, NaOH y el amortiguador biológico HEPES para observar la capacidad de remoción de los hongos filamentosos (Văcar et al., 2021).

Se planificaron 12 tratamientos experimentales, con 3 réplicas por cada variable, obteniéndose un total de 16 unidades experimentales junto a su grupo control, a con una concentración alrededor 25 ppm para Cu y Ni en matraces de 100 ml.

### **3.5.3. Diseño experimental**

El modelo experimental pertenece a un arquetipo cuantitativo para evaluar la hipótesis, medir y comparar resultados mediante un grupo experimental y uno de control con enfoque en la concentración de metales pesados antes y después del tratamiento *in vitro*.

Figura 5 Esquema experimental para los tratamientos con las cepas seleccionadas.



Elaborado por: (Los autores, 2024)

### 3.5.4. Inoculación de esporas en medio experimental

Se inoculo 1 mL de la suspensión de esporas en los matraces que contenían 50 mL de los medios suplementados con los contaminantes. Los cuales fueron llevados a la incubadora Heidolph Plug & Play Agitador de plataforma Unimax1010 a 28°C a 120 rpm por 6 días para *Aspergillus sp.* y 6 días en incubación para las unidades experimentales con *Fusarium sp.*

### 3.5.4. Digestión y análisis del tratamiento experimental

Para llevar a cabo la digestión de las muestras se empleó el método indirecto de concentración de metales pesados descrito por Hidalgo & Osorio (2013) en donde se tomó 1 mL de cada uno de los medios de cultivo PDB y Czapek modificado, a los cuales se les adiciono 10 mL de ácido nítrico concentrado y 2 mL de peróxido de hidrogeno. La solución se dejó

reposar por un tiempo determinado dentro de la cabina de flujo laminar y por último se aforó con agua destilada.

### **3.6. Análisis estadístico**

Se emplearon las medias de los controles y las alícuotas tomadas durante los 6 días de tratamiento para *Fusarium sp.* y *Aspergillus sp.* Evaluándose la normalidad de los datos por medio de la prueba estadística Shapiro-Wilks.

## Capítulo 4

### Resultados y discusiones

#### 4.1. Ubicación de zonas de muestreo

Se señalan etapas de muestreo del Estuario del Estero Salado de Guayaquil georreferenciadas en coordenadas UTM, como puede encontrar en la Tabla 3.

*Figura 6. Sección del mapa del Ecuador que muestra la ubicación de muestreo.*



Obtenido de: Google Earth, elaborado por Los autores (2024).

*Tabla 3. Crecimiento de colonias fúngicas en concentración mínima del contaminante.*

Zonas	Ubicación	Crecimiento y selección de colonias inoculadas en medios contaminados	
Z1		Cu: PC <i>Aspergillus sp</i> , <i>Fusarium sp</i> .	NS

	Malecón Miraflores		
		Ni: PC <i>Aspergillus sp.</i>	NS
Z2	Avenida Barcelona	Cu: AC	NS
		Ni: AC	NS
Z3	Puente 5 de junio	Cu: PC; <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Fusarium sp.</i>	S
		Ni: PC <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Fusarium sp.</i>	S
Z4	Kennedy Norte	Cu: PC <i>Aspergillus sp.</i>	NS
		Ni: PC <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Fusarium sp.</i>	NS

PC: Presencia de crecimiento; AC: Ausencia de crecimiento; NS: No seleccionada); S: Seleccionada.

**Elaborado por:** Los autores (2024)

Se evidenció el crecimiento de las colonias de interés en medio SDA + Cu y SDA + Ni, en las placas madre con una concentración mínima del contaminante, basándonos en el crecimiento micelial. A partir de los 7 días transcurridos se observó el crecimiento de las cepas aisladas de *Aspergillus sp.* y *Fusarium sp.*, de la misma zona de muestreo.

El desarrollo de colonias de *Aspergillus sp.*, resulta ser común en muestras de sedimentos, sin embargo, su proliferación también puede darse en suelos agrícolas como se especificó en la investigación de Hong et al., (2010). De igual forma, algunas especies de *Fusarium* como *Aspergillus* pueden ser aisladas de suelos de mangles, así como se señala en Saremi & Saremi, (2013).

#### 4.2. Análisis fisicoquímico de las muestras de sedimentos

Los parámetros fisicoquímicos se utilizan para determinar la calidad de los sedimentos y permite verificar sus características a lo largo del tiempo.

#### 4.2.1. Potencial de hidrogeno (pH), conductividad y porcentaje (%) de humedad

Se obtuvieron los valores para la determinación de pH, conductividad y % de humedad de las muestras de sedimentos, las cuales se muestran en Anexo 5.

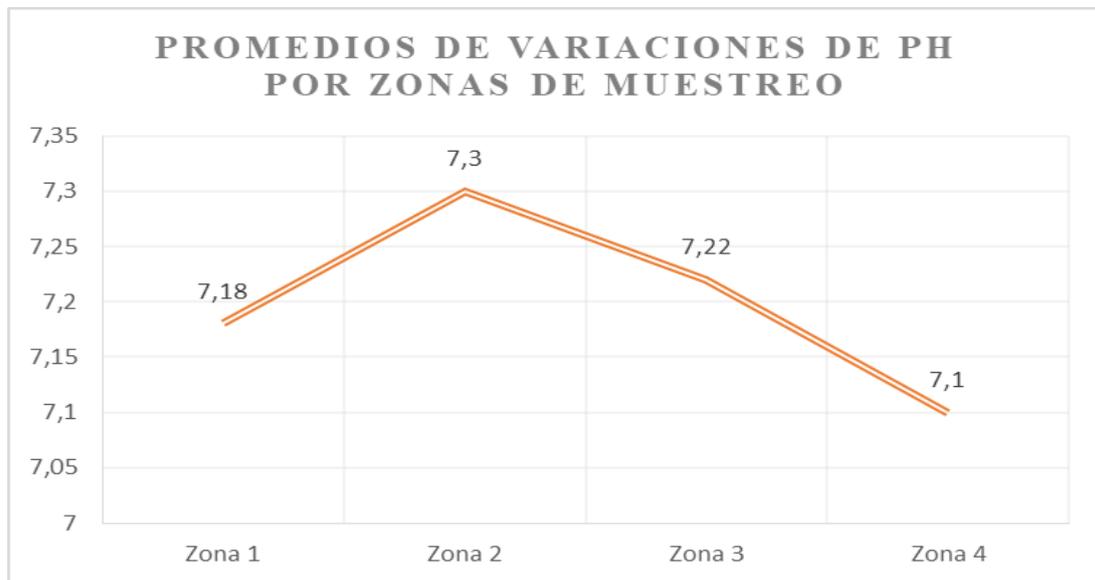
A continuación, se puede apreciar en la Tabla 4 y Figuras 7,8 ,9 el resumen de los valores promedios de variaciones de pH, conductividad y % de humedad por cada zona delimitada, junto a sus gráficas detalladas en los anexos 6, 7 y 8.

**Tabla 4.** Valores promedios de pH, conductividad y % de humedad por zonas.

<b>Zonas de muestreo</b>	<b>Promedio de pH</b>	<b>Promedio de conductividad. mS/cm</b>	<b>Promedio %Humedad</b>
Zona 1	7.18	3.078	43.16
Zona 2	7.3	5.152	56.6
Zona 3	7.22	4.602	76.42
Zona 4	7.1	3.054	50.66

**Elaborado por:** Los autores (2024)

**Figura 7.** Gráfica de variaciones de pH en las zonas de muestreo.



**Elaborado por:** Los autores (2024)

- **Medición de pH**

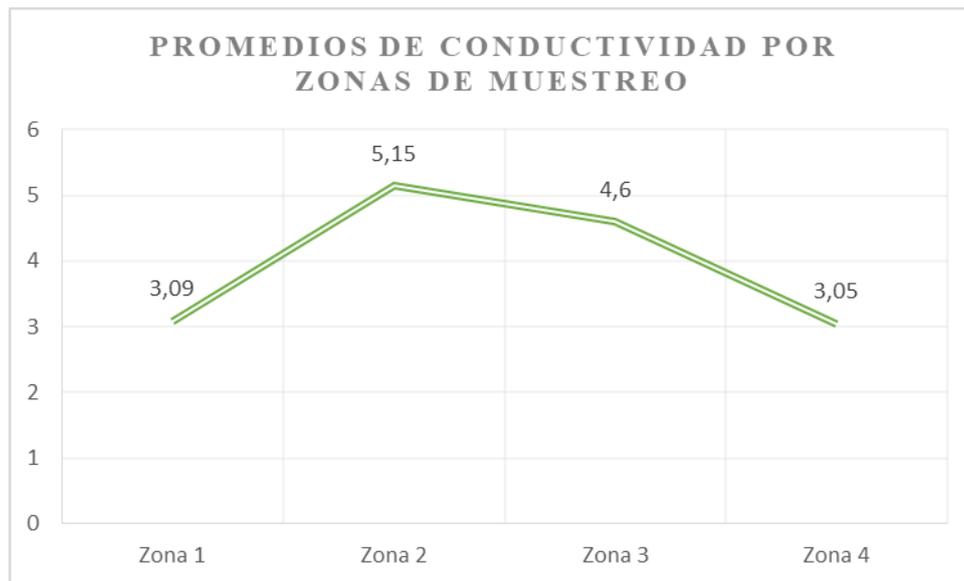
En cuanto al análisis de pH, se presentaron valores neutros, considerándose el resultado más elevado obtenido en el P09 (7,54) y el menor en el P21 (6,64), tal como se observa en el Anexo 5, por ende, al realizar el promedio de los datos, se verificó que la zona 2 posee un promedio de 7,3 y la zona 4 corresponde a 7,1; en contraste con la norma en el Anexo 3.

Al existir variaciones de pH en las muestras de sedimentos, se puede ver afectada la distribución de flora y fauna nativa (Torres et al., 2018). Un pH más alto puede influir en el desarrollo de las comunidades microbianas (Pu et al., 2023).

Como es mencionado por Rodríguez et al. (2018), la variabilidad del pH aporta información para determinar la calidad y solubilidad de sustancias que puedan encontrarse en el ecosistema, lo cual incide en la manera en que los compuestos orgánicos e inorgánicos son almacenados o solubilizados por especies del medio.

Existen varios estudios que comparten valores promedio de pH bastante similares a los obtenidos en el presente estudio: 7,98 y 7,67 (Zavaleta De la Cruz et al., 2021), 7,53 y 7,65 (Pernía, Mero, et al., 2018), 6,58 y 7,10 (Rebolledo Monsalve et al., 2023), 6,5 y 7,1 (Torres et al., 2023).

**Figura 8.** Gráfica variaciones de conductividad en las zonas de muestreo.



**Elaborado por:** Los autores (2024)

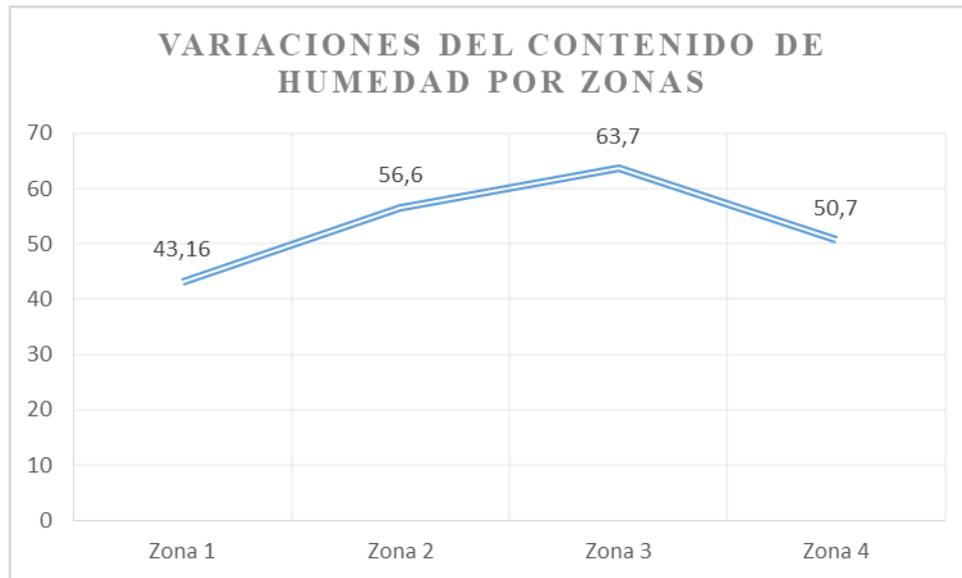
- **Medición de Conductividad**

Con respecto a los valores de conductividad, el valor más alto se obtuvo en el P08 (6,02) y el más bajo corresponde a P04 (2,03). Los promedios de conductividad por zona de muestreo están representados en la Figura 8, donde se obtuvo como promedio máximo el de la zona 2 y como promedio mínimo el de la zona 4.

Según López et al., (2012), la conductividad se puede ver afectada por las condiciones ambientales, al existir un incremento de la temperatura en los sedimentos, los niveles de esta pueden disminuir.

Si nos guiamos por la normativa del Consejo Canadiense del Ministerio del Medio Ambiente, los valores máximos permitidos de conductividad en sedimentos, Anexo 4, los valores de conductividad registrados en los sedimentos muestreados no representan riesgo alguno.

**Figura 9.** Gráfica variaciones de contenido de humedad (%) en las zonas de muestreo.



**Elaborado por:** Los autores (2024)

- **Medición de Humedad**

En la tabla 4, se pueden observar los valores promedios obtenidos a partir de la determinación del contenido de humedad, delimitado por cada zona de muestreo. Datos con los cuales se realizaron las gráficas respectivas, como se muestran en la Figura 9 y el Anexo 8.

El valor máximo de humedad medido entre las muestras de sedimento tomadas a las orillas del Estero Salado pertenece al P11 con 73,2% y el valor mínimo obtenido corresponde al P17 con 18,5%. Como se puede comprobar en el Anexo 5. Se observa en la Figura 9 que el mayor contenido promedio de humedad está presente en la zona 3 y el de menor contenido forma parte de la zona 1 correspondiente al sector Miraflores.

Al obtenerse valores por encima del 60% de humedad en la zona 3, se determina que puede existir una mayor proliferación de estructuras fúngicas, puesto que favorece a la fisiología del hongo y además favorece a su reproducción por medio de la liberación de esporas (Sánchez & Almaguer, 2014).

En el estudio realizado por Zavaleta De la Cruz et al. (2021) se indican valores similares en la caracterización fisicoquímica de sedimentos, el mayor porcentaje de humedad fue de 67.43%, mientras que el porcentaje menor fue de 59,70%.

#### **4.2.2. Resultados de la determinación de concentración de metales pesados en sedimentos del Estero Salado mediante ICP-OES**

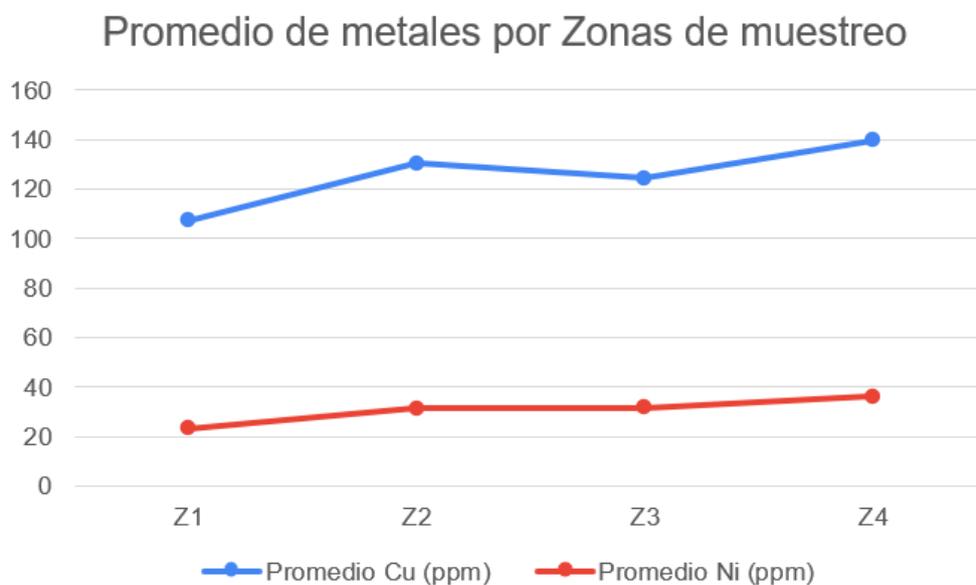
Estos resultados nos indican que la zona con mayor incidencia de metales pesados fue la Zona 4, como se resalta en la Figura 10.

**Tabla 5.** *Promedio de concentraciones de Cobre y Níquel en muestras de sedimento procedentes del Estero Salado.*

<b>Zonas de muestreo</b>	<b>Promedio Cu (ppm)</b>	<b>Promedio Ni (ppm)</b>
Z1	107.24	23.36
Z2	130.32	31.24
Z3	124.4	31.76
Z4	139.68	36.24

**Elaborado por:** Los autores (2024)

**Figura 10.** Gráfica del promedio de muestras por zonas



**Elaborado por:** Los autores (2024)

Dentro de valores obtenidos en el Anexo 15. podemos observar los valores máximos y mínimos de los contaminantes. El valor más significativo de cobre fue en el P19 (232.9 ppm) y el menos significativo fue en P17 (65,1 ppm). Sin embargo, también se encontró que todos los puntos sobrepasaron los límites máximos permisibles en zonas residenciales. Los puntos de mayor concentración de níquel fueron el P14 (50,3 ppm) y el P19 (44,4 ppm), aquellos puntos con menor concentración fueron el P20 (10 ppm) el P03 (18,4 ppm).

En el trabajo realizado por (Fernández-Cadena et al., 2014) se llevó a cabo una exhaustiva investigación para determinar las concentraciones que alberga el ecosistema Estero Salado, en dicho estudio se evaluó la presencia de B, Cr, Pb, Cu, Ni. Co, Cd, Se, V y Zn en altas concentraciones e incluso se menciona que los valores sobrepasan los estándares internacionales de calidad ambiental. Una concentración dominante de metales traza para Cr y Cu puede estar relacionada con la contaminación generada por el derrame de combustibles o aceites (Chen et al., 2019).

También se han reportado valores de otros contaminantes, luego de un muestreo en la estación del Puente Ecológico, Puente Miraflores, Puente Portete y Puente Perimetral los cuales

mantuvieron índices máximos y mínimos de cadmio (9,5-1,49) ppm, cromo (43,47-11,99) ppm y plomo 69,47- 13,47) ppm (Alcívar et al., 2011).

Cabe mencionar que una mayor contaminación por níquel puede atribuirse al clima tropical de las zonas costeras, como lo menciona Achyuthan et al., (2002) en su estudio de sedimentos en India, las descargas industriales, como plásticas y metalúrgicas que provocan altos niveles de níquel (el máximo registrado fue de 782 ppm) a lo largo del cauce.

### Resultados de resiembra en medios con distintas concentraciones del contaminante

Luego de 7 días de incubación los hongos seleccionados se desarrollaron y se adaptaron al medio SDA con el gradiente de concentraciones de cobre y níquel, como se muestra en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Crecimiento de colonias fúngicas sometidas a concentraciones mínimas, intermedias y altas.

Metal	Hongo	Concentración mínima (5 ppm)	Concentración media (20 ppm)	Concentración alta (40 ppm)
Cobre	<i>Aspergillus sp.</i>			
<b>Tipo de crecimiento:</b>		Máximo, esporulación media	Máximo, esporulación total	Máximo, esporulación mínima
Níquel	<i>Aspergillus sp.</i>			
<b>Tipo de crecimiento:</b>		Máximo, esporulación media	Máximo, esporulación media	Máximo, esporulación media

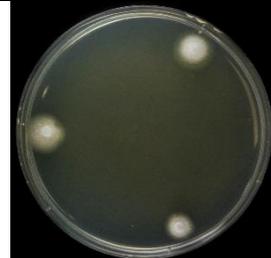
**Elaborado por:** Los autores (2024)

Como se puede apreciar en la Tabla 6, las colonias de *Aspergillus sp.* se han desarrollado en su mayoría, tanto en Cu como en Ni, en su totalidad, con las incidencias de su

falta de esporulación o cualidades atrofiadas. En calidad de análisis cualitativo, esta cepa de *Aspergillus sp.* es acertado decir que resiste a concentraciones medias de 20 ppm en cobre y, con consideración sobre la visibilidad de su capacidad de esporulación, en valores medios de 20 ppm en níquel.

En el estudio realizado por Iba-Villalba et al., (2022), se menciona que las cepas estudiadas de *Aspergillus* tuvieron una resistencia a altas concentraciones de cobre, una de ellas con una resistencia de 20 mM de este metal. Para níquel, el artículo de Basil et al., (2021), podemos encontrar que la cepa de *Aspergillus* utilizada es de una resistencia mucho mayor, ya que se inocula en concentraciones mayores a 200 ppm del contaminante, hasta llegar a 1600 ppm de níquel, de los cuales pudo resistir y seguir siendo viable hasta los 600 ppm de este metal, dado que, en mayores cantidades, disminuye la viabilidad de esta cepa.

**Tabla 7.** Crecimiento de colonias fúngicas sometidas a concentraciones mínimas, intermedias y altas.

Cobre	<i>Fusarium sp.</i>			
<b>Tipo de crecimiento:</b>		Máximo	Medio	Mínimo, crecimiento atrofiado
Níquel	<i>Fusarium sp.</i>			
<b>Tipo de crecimiento:</b>		Medio	Mínimo	Mínimo

**Elaborado por:** Los autores (2024)

A diferencia de la cepa de *Aspergillus*, el comportamiento de *Fusarium sp.* frente a las diferentes concentraciones de metales contaminantes fue distinto en su totalidad, de manera cualitativa podemos observar que solo una siembra tuvo crecimiento máximo en placa, la cual

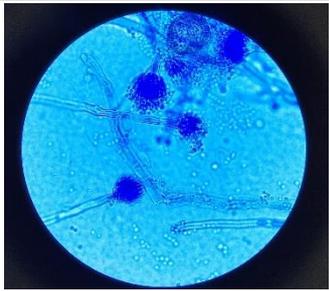
fue en 5 ppm de cobre, aunque todas tuvieron un desarrollo notable. Mientras que, en níquel, las placas inoculadas del microorganismo presentan de medio a mínimo crecimiento en concentraciones apenas altas, lo que nos da a entender que estos niveles del metal son en gran medida, tóxicos para la cepa.

En el artículo divulgado por Bonilla et al., (2021) donde se estudiaron cepas de *Fusarium* contra diferentes concentraciones de metales tóxicos, entre ellos cobre en cantidades de 60-90 uL/mL, tuvieron como resultado que las cepas estudiadas son resistentes hasta 90 uL/mL de cobre.

#### 4.3. Resultados en la identificación y caracterización morfológica

La identificación de las cepas fúngicas se observará en la Tabla 8, donde se realizaron resiembras sucesivas para su aislamiento con los cuales se determinaron las características principales de los hongos seleccionados para el tratamiento micorremediador. Basándonos, en las características macroscópicas y microscópicas establecidas en libros, guías y artículos mencionados en el capítulo anterior.

**Tabla 8.** Caracterización morfológica de cepas procedentes del Estero Salado.

<i>Género</i>	Estructura Macroscópica	Estructura Microscópica (Zoom x100)
<i>Aspergillus sp.</i>		
<b>Descripción de características morfológicas</b>	De rápido crecimiento, colonia de aspecto polvoriento con tonalidades oscuras. Reverso amarillento.	Conidio simples y largos, vesícula globosa. Presenta dos series de fiálides.

<i>Fusarium sp.</i>		
<b>Descripción de características morfológicas</b>	De lento crecimiento, presenta una pigmentación salmón-rojiza y un micelio aéreo liso. Reverso carmín oscuro.	Micro conidios, redondeados, en cadena o individuales.

**Elaboración por:** Los autores (2024)

Para la identificación cualitativa del género *Aspergillus sp.* se observaron las características macroscópicas según (Barnett & Hunter, 1986) como su pigmentación negra en el centro, el reverso de tonalidades amarillas, el aspecto polvoriento de la colonia y las características microscópicas de acuerdo con las estructuras del anexo 12, se visualizaron conidióforos simples, vesículas globosas y dos series de fiálides.

Así mismo, la identificación cualitativa de *Fusarium sp.* estuvo determinada por su pigmentación característica, al observarse tonalidades salmón y rojo carmín en el anverso del cultivo. De igual manera, las características microscópicas fueron observadas y se identificaron micro conidios redondeados, tal como en los estudios realizados por Nelson et al., (1994).

#### 4.3.1. Conteo de esporas

En la tabla 9 se observan las concentraciones de células por mililitro ideales tanto para la inoculación de *Aspergillus sp.* y *Fusarium sp.* en los tratamientos de biorremediación.

**Tabla 9.** Células por ml para inoculación

Cepa biorremediadora	Promedio N° de esporas entre compartimentos	Total esporas cel./ml
----------------------	---	-----------------------

<i>Aspergillus sp.</i>	88	$2.2 \times 10^6$
<i>Fusarium sp.</i>	63	$1.5 \times 10^6$

**Elaborado por:** Los autores (2014)

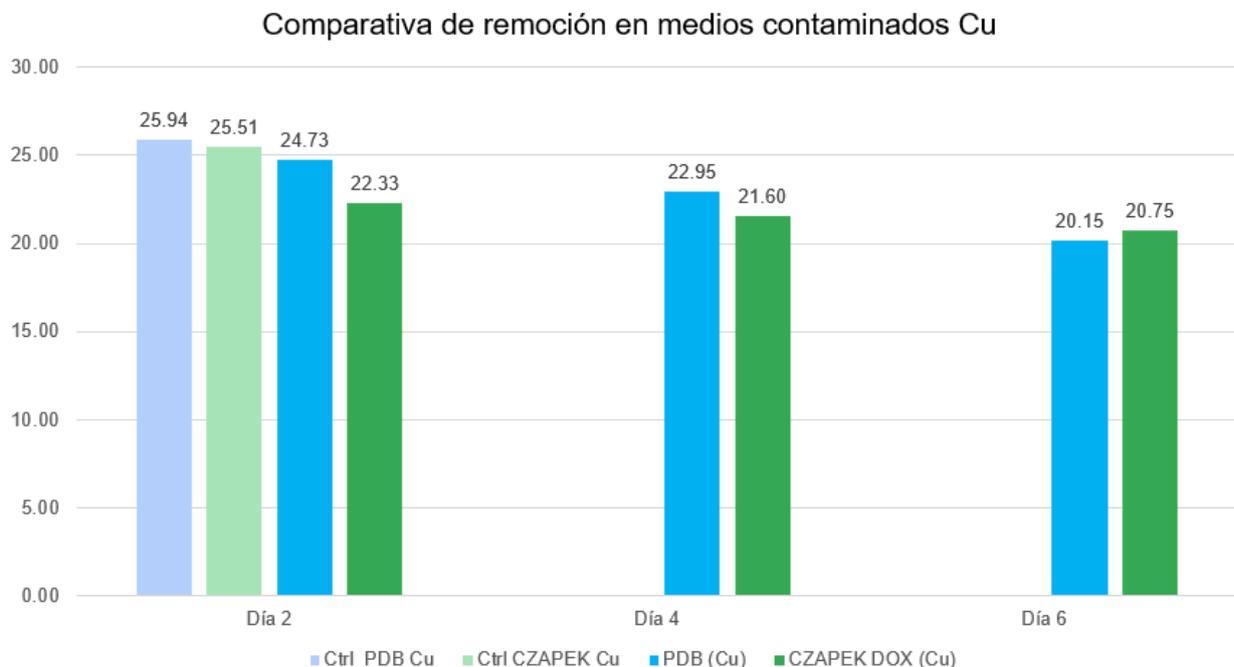
La concentración de esporas aplicada en los tratamientos para evaluar la capacidad micorremediadora de metales pesados en cobre y níquel, fue establecida de acuerdo con estudios realizados con anterioridad. La concentración de esporas para *Aspergillus sp* donde utilizaron tratamientos *in vitro* fue de  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^6$  para *Fusarium sp* (Mohammed & Khedr, 2021; Villalba-Villalba et al., 2022)

#### 4.4. Resultados del análisis microbiológico

En estas gráficas se observarán las comparativas de remoción para cobre, entre los medios PDB y Czapek Dox hasta el sexto día después de la siembra del inóculo.

##### 4.4.1. *Aspergillus sp.*

**Figura 11.** Gráfica de comparativa de remoción en medios de 25 ppm Cu(aprox).

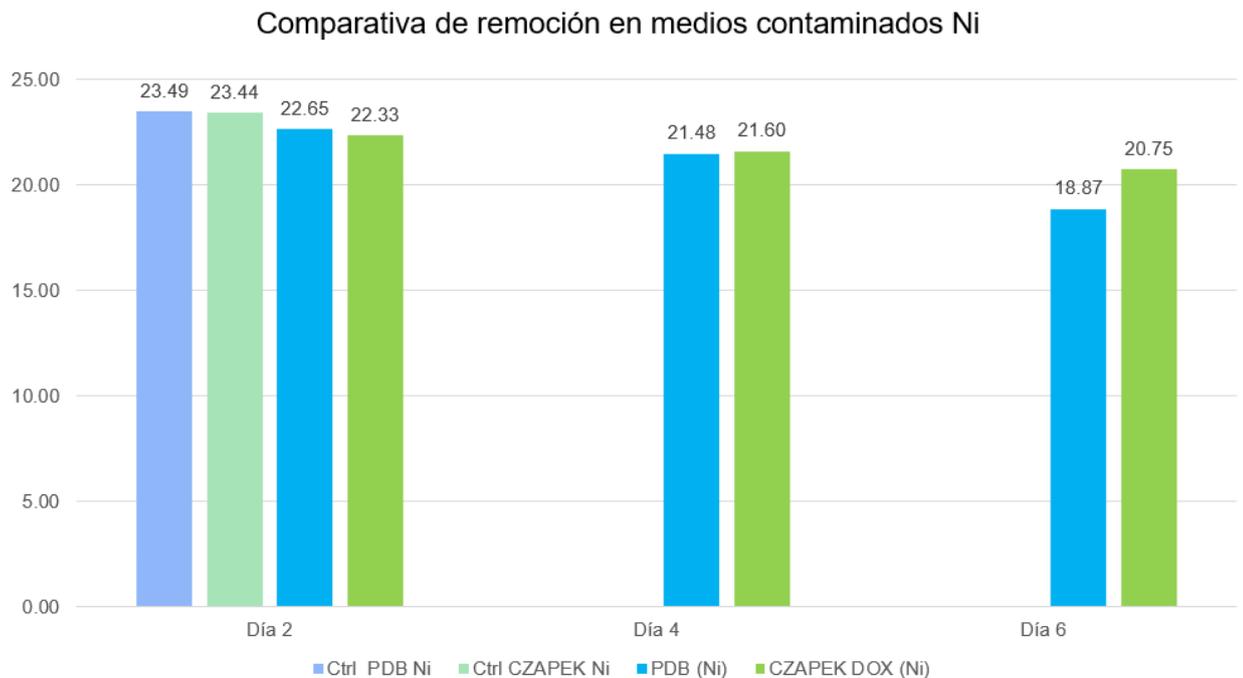


**Elaborado por:** Los Autores (2024)

Se evidencia un porcentaje de remoción de cobre en medio PDB al día 2 de 4,6%, al día 4 de 11,5% y al día 6 de 22,3%. Para Czapek Dox podemos constatar los valores de porcentaje de remoción que se encuentran en 2,7% al día 2, 7,9% al día 4, con un porcentaje final 12,7% para el día 6, lo que nos da la consideración que esta cepa de *Aspergillus* tiene una capacidad micorremediadora mínima ante la concentración de 25 ppm (aproximados) de cobre. Al tomar en cuenta el hecho de las diferencias nutricionales que presentan los medios, podemos destacar que tuvo un mayor porcentaje de remoción en PDB, con una remoción final del 22,3% frente al 12,7% del medio Czapek Dox al día 6.

En investigaciones similares se muestra al hongo *A. flavus* con mejor capacidad de biosorción en Cu al ser incubado por un plazo más largo (14 días) que obtuvo promedios de remoción mayores al 80% (Bano et al., 2018). Así mismo, en otra investigación, se determinó un alto porcentaje de remoción (70,98%) con la cepa *Aspergillus spp.* con la consideración de un medio de cultivo distinto (Romero & Bustamante, 2023).

**Figura 12** Gráfica de comparativa de remoción en medios de 25 ppm Ni (aprox)



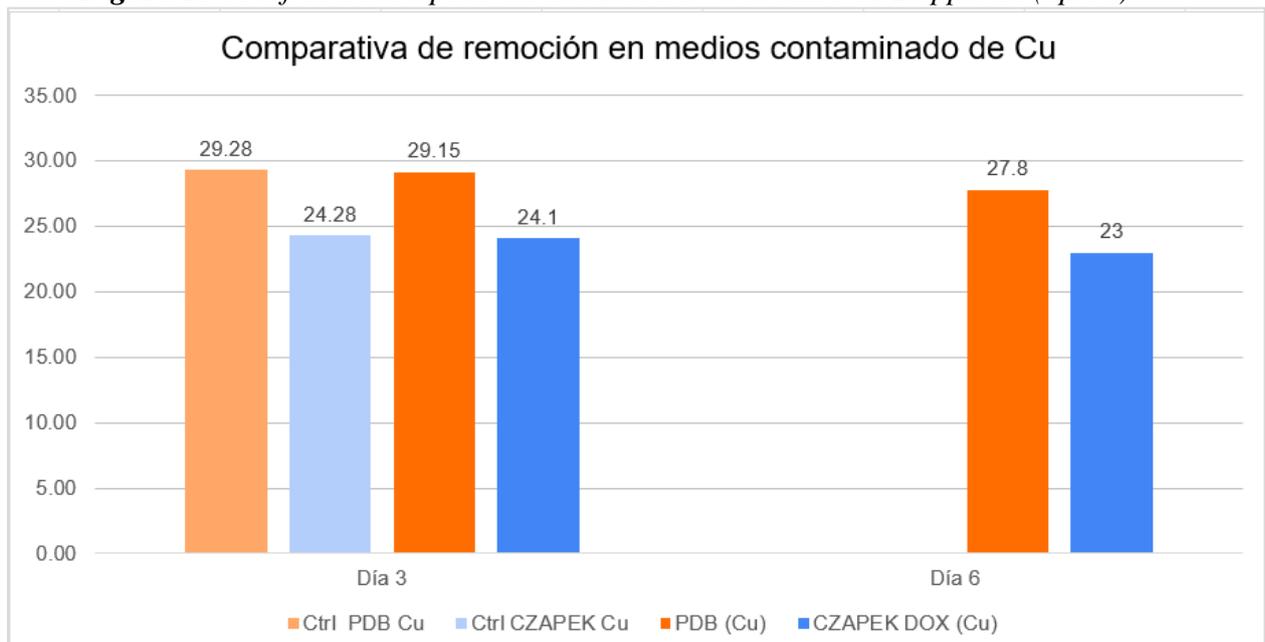
**Elaborado por:** Los autores (2024)

Se evidencia un porcentaje de remoción de cobre en medio PDB al día 2 de 3,6%, al día 4 de 8,5% y al día 6 de 19.7%. Para Czapek Dox podemos constatar los valores de porcentaje de remoción que se encuentran en 4,7% al día 2, 7,9% al día 4, con un porcentaje final 11,5% para el día 6, con esto podemos llegar al hecho que esta cepa de *Aspergillus* tiene una capacidad micorremediadora mínima ante la concentración de 25 ppm (aproximados) de níquel. Si tomamos en cuenta el hecho de las diferencias nutricionales de los medios, podemos destacar que tuvo un mayor porcentaje de remoción en PDB, con una remoción final del 19,7% frente al 11,5% del medio Czapek Dox al final, día 6.

En un estudio realizado por Dwivedi et al. (2012), se estableció que el tiempo de remoción para Pb, Ni y Cr se mantuvo en condiciones constantes de temperatura ( $27 \pm 2^\circ\text{C}$ ) durante un periodo de 4 días, mostrando resultados positivos en el tratamiento modificado con Ni y *A. flavus*. Estos resultados, también contrastan con la eficiencia remoción obtenida en el tratamiento PDB + Ni.

#### 4.5.2. *Fusarium sp.*

**Figura 13.** Gráfica de comparativa de remoción en medios de 25 ppm Cu(aprox).

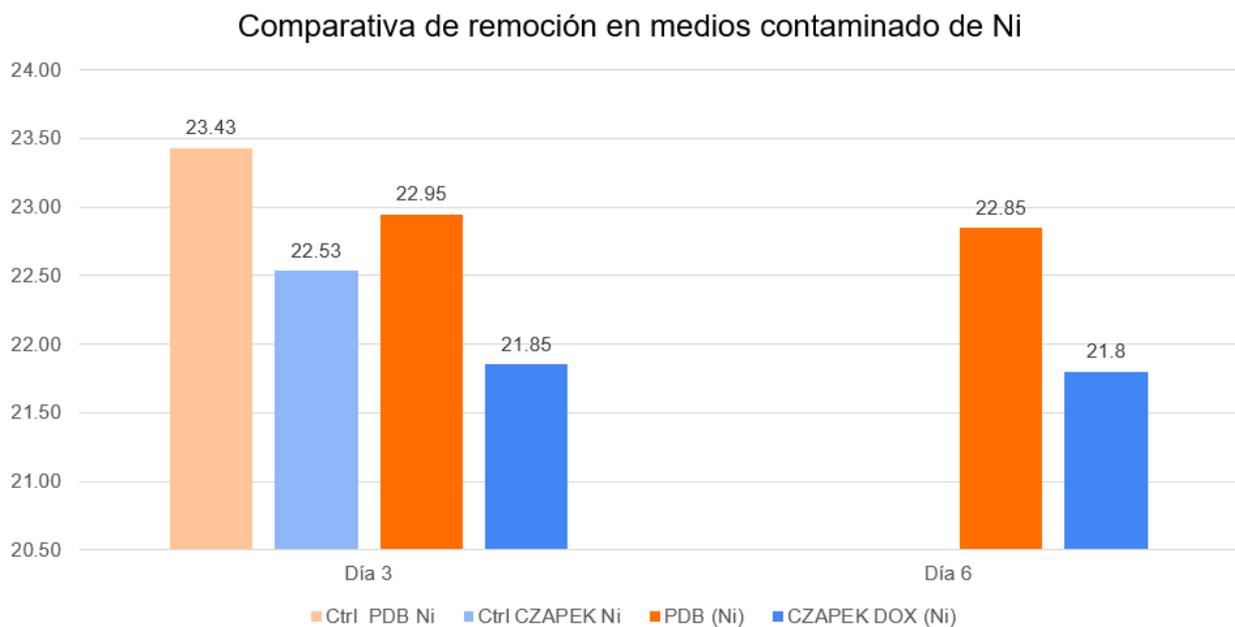


**Elaborado por:** Los autores (2024)

Podemos observar el porcentaje de remoción de cobre en medio PDB al día 3 de 0,5% y al día 6 de 5,1%. En cuanto al medio Czapek Dox podemos encontrar los valores de porcentaje de remoción que se encuentran en 2,1% al día 3 y de 2,5% al día 6, con lo que entendemos que esta cepa de *Fusarium* no presenta una capacidad micorremediadora más que mínima ante la concentración de 25 ppm (aproximados) de cobre. Considerándose el hecho de las diferencias nutricionales que presentan los medios, podemos decir que entre ambos medios destaca PDB con 5,1% contra Czapek Dox con 2,5%.

En investigaciones relacionadas se pudo determinar que las concentraciones del metal, en el tiempo inicial y luego de 120 h de cultivo con el hongo *F. tricinctum M6*, presentaron valores de 34,7% de remoción del contaminante Cu (II) (Bonilla et al., 2021b).

**Figura 14.** Gráfica de comparativa de remoción en medios de 25 ppm Ni (aprox).



**Elaborado por:** Los autores (2024)

Podemos observar el porcentaje de remoción de cobre en medio PDB al día 3 de 0,8% y al día 6 de 5,3%. En cuanto al medio Czapek Dox podemos encontrar los valores de porcentaje de remoción que se encuentran en 3% al día 3 y de 3,3% al día 6, con lo que entendemos que esta cepa de *Fusarium* no presenta una capacidad micorremediadora más que

mínima ante la concentración de 25 ppm (aproximados) de níquel. Ahora, comparando el hecho de las diferencias nutricionales que presentan los medios, podemos señalar que tuvo un mayor porcentaje de remoción en PDB, con una remoción final del 5,3% frente al 3,3% del medio Czapek Dox al sexto día.

En varios estudios se ha realizado el aislamiento de cepas de *Fusarium solani* que muestra valores de 60% de capacidad para remover trazas de Cu y Zn (J. Hong et al., 2009). Cabe mencionar que también se han hecho investigaciones comparado las dos condiciones nutricionales (PDB y Czapek Dox) utilizando un consorcio conformado por dos cepas fúngicas (*Penicilium sp.* y *Fusarium sp.*), no obstante, el tratamiento mostró resultados significativos con el medio PDB (Pan et al., 2009).

#### 4.6. Análisis estadístico de la cepa *Aspergillus sp.* en el medio PDB

Los resultados generados por el programa Shapiro-Wilks permitieron constatar que las pruebas con el medio de cultivo PDB tienen una distribución normal.

**Figura 15** Prueba de normalidad para *Aspergillus* en PDB+Cu día2

Pruebas de Normalidad para PDB 1		
Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,933702	0,502637

**Elaborada por:** Los autores (2024), con ayuda del programa Statgraphics Centurion 18.

Aquí se muestran los resultados de diversas pruebas realizadas para determinar si PDB 1 puede modelarse con una distribución normal.

Debido a que el valor-P de las pruebas realizadas es mayor o igual a 0,05, no se puede rechazar la idea de que PDB 1 proviene de una distribución normal con 95% de confianza.

**Figura 16** Prueba de normalidad para *Aspergillus* en PDB+Cu día 4

**Pruebas de Normalidad para PDB 2**

Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,826032	0,178289

**Elaborada por:** Los autores (2024), con ayuda del programa Statgraphics Centurion 18.

Se muestran los resultados de diversas pruebas realizadas para determinar si PDB 2 puede modelarse con una distribución normal.

Debido a que el valor-P es mayor o igual a 0,05, no se puede rechazar la idea de que PDB 2 proviene de una distribución normal con 95% de confianza.

**Figura 17** Prueba de normalidad para *Aspergillus* en PDB+Cu día 6

**Pruebas de Normalidad para PDB 3**

Prueba	Estadístico	Valor-P
Estadístico W de Shapiro-Wilk	0,994361	0,856445

**Elaborada por:** Los autores (2024), con ayuda del programa Statgraphics Centurion 18.

Mostramos también los resultados de diversas pruebas realizadas para determinar si PDB 3 puede modelarse con una distribución normal.

Debido a que el valor-P es mayor o igual a 0,05, no se puede rechazar la idea de que PDB 3 proviene de una distribución normal con 95% de confianza.

## Capítulo 5

### Conclusiones y recomendaciones

#### Conclusiones

- Se determinaron los parámetros fisicoquímicos para evaluar las condiciones de pH con valores en promedio de 7 encontradas en las muestras de sedimento de las cuatro zonas estudiadas, teniendo en cuenta que valores más ácidos de este parámetro afectaría de manera negativa la actividad microbiana; la conductividad y el porcentaje de humedad que se presenta en las muestras de suelo nos ayudan a entender las condiciones en las que se desarrollaban las cepas aisladas, siendo los valores del punto de interés (P14 Y P12) cercanos a 4 mS/mL de conductividad y 60% en humedad, lo que es ideal para promover el desarrollo de fúngico.
- Se desarrollaron cultivos monospóricos en los que *Aspergillus* tuvo un crecimiento considerable en comparación con *Fusarium*, de los cuales, *Aspergillus* presentó tolerancia importante a metales pesados cobre y níquel, mientras que *Fusarium* tuvo un crecimiento reducido tanto en medio sólido, como en el experimento con medio líquido.
- Se caracterizó la morfología macroscópica y microscópica, según las claves taxonómicas para determinar la presencia de estructuras y características del género *Aspergillus*, como conidios globosos conectados a su vesícula y presencia de fiálides, mientras que, para *Fusarium*, se estableció que la visualización de micro conidios es propio de los diferentes tipos de esporas que pueden ser producidos por este género.
- Se cuantificó el contenido de metales pesados (Cu y Ni) en sedimentos del Ecosistema manglar Estero Salado, por cada zona de muestreo establecidas en el estudio donde la zona más representativa fue la zona 4, en el punto 19 con 239 ppm de cobre, en comparación con el punto del que fueron aisladas las cepas, P14 con 160 ppm de Cu y

50 ppm de Ni, leídas en el equipo ICP-OES. Sin embargo, estos hongos no presentaron, *in vitro*, el nivel de tolerancia ni remoción que aparenta tener en el suelo del que fue extraído, pues bien, a más de 20 ppm de estos metales se obtuvieron bajos niveles de remoción, el máximo siendo 22.3% en cobre y 19.7% en níquel para *Aspergillus sp.* y con valores mínimos para *Fusarium sp.* de 5,1% en cobre y 5,3% en níquel.

### **Recomendaciones**

- Evaluar la capacidad de tolerancia en medios de cultivo sólidos selectivos con más de 100 ppm y condicionar el crecimiento de las colonias de interés en medios de cultivo líquidos.
- Es recomendable leer las alícuotas del tratamiento, por el método de filtrado fúngico, para obtener un mayor porcentaje de eliminación de iones metálicos y tomar la muestra de manera superficial para evitar la digestión de esta.
- Se pone en consideración, evaluar a profundidad el metabolismo del género *Fusarium* y *Aspergillus* para futuras investigaciones y aplicaciones en tratamientos *in vitro*.
- Es importante, realizar una identificación molecular para tener un respaldo, luego de la identificación de las características morfológicas macroscópicas y microscópicas de las taxas seleccionadas.
- Tomar en cuenta, evaluar el tiempo de tratamiento óptimo para obtener un mayor índice de remoción. Dependiendo del tipo de hongo de interés.
- Realizar evaluaciones cinéticas de temperatura, pH, concentraciones nutricionales y el tiempo de incubación para asegurar la viabilidad de las esporas en el tratamiento.

## Bibliografía

- Achyuthan, H., Srinivasalu, S., & Kandasamy, S. (2002). Trace metals concentrations in the sediment cores of estuary and tidal zones between Chennai and Pondicherry, along the east coast of India. In *Article in Indian Journal of Geo-Marine Sciences*.  
<https://www.researchgate.net/publication/216736587>
- Ahmad, M. S. A., & Ashraf, M. (2012). *Essential Roles and Hazardous Effects of Nickel in Plants* (pp. 125–167). [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0668-6\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0668-6_6)
- Alcívar, Mosquera, & Castro. (2011). Concentración de metales pesados (Cr total, Pb, Cd) en agua superficial y sedimentos en el Estero Salado (Guayaquil). *Revista Científica Ciencias Naturales y Ambientales*.
- Alexopoulos, Mims, & Blackwell. (1996). *Introductory Mycology* (4th ed.).
- Altimira. (2010). *Efectos del cobre en altas concentraciones sobre la diversidad de las comunidades bacterianas de suelos agrícolas de la región de Valparaíso*.  
<https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/112092>
- Bano, A., Hussain, J., Akbar, A., Mehmood, K., Anwar, M., Hasni, M. S., Ullah, S., Sajid, S., & Ali, I. (2018). Biosorption of heavy metals by obligate halophilic fungi. *Chemosphere*, 199, 218–222. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.02.043>
- Barceloux, D. G., & Barceloux, D. (1999). Nickel. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 37(2), 239–258. <https://doi.org/10.1081/CLT-100102423>
- Barnett, & Hunter. (1986). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi* (4th ed.).
- Barzallo, D., Vera, H., Gavin, C., & Lazo, R. (2021). Determinación simultánea de metales traza en muestras de suelo mediante espectrometría de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES). *Ecuadorian Science Journal*, 5(4), 130–139.  
<https://doi.org/10.46480/esj.5.4.176>
- Basil, Z., Masoud Bazgir, A. ;, Zagher, F., & Kakhki, V. (2021). *Investigation of the ability of Aspergillus niger fungus on the removal of heavy metals, such as lead, cadmium, and nickel* (Vol. 25). <http://annalsofrscb.ro>
- Bhandari, G. (2017). *Mycoremediation: An Eco-friendly Approach for Degradation of Pesticides* (pp. 119–131). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-68957-9\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-319-68957-9_7)
- Bharath, Y., Singh, S. N., Keerthiga, G., & Prabhakar, R. (2019). Mycoremediation of Contaminated Soil in MSW Sites. In *Waste Management and Resource Efficiency* (pp. 321–329). Springer Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-10-7290-1\\_28](https://doi.org/10.1007/978-981-10-7290-1_28)
- Bonilla, J. O., Callegari, E. A., Paez, M. D., Gil, R. A., & Villegas, L. B. (2021a). Characterization of copper stress response in *Fusarium tricinctum* M6: A metal-resistant microorganism isolated from an acid mine drainage-affected environment. *Journal of Hazardous Materials*, 412, 125216. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125216>
- Bonilla, J. O., Callegari, E. A., Paez, M. D., Gil, R. A., & Villegas, L. B. (2021b). Characterization of copper stress response in *Fusarium tricinctum* M6: A metal-resistant

- microorganism isolated from an acid mine drainage-affected environment. *Journal of Hazardous Materials*, 412, 125216. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.125216>
- Brewer, G. J. (2010). Risks of Copper and Iron Toxicity during Aging in Humans. *Chemical Research in Toxicology*, 23(2), 319–326. <https://doi.org/10.1021/tx900338d>
- Calero, R. (2010). *La Gobernanza del Estero Salado* . <https://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/10197/1/Tesina%20Gobernanza%20Estero%20Salado.pdf>
- Canadian Council of Ministers of the Environment. (2015). *Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health*. <https://ccme.ca/en/summary-table>
- Ceballos, M. (2020). Comportamiento físico – químico del cobre en obras civiles. Una perspectiva desde la química analítica. *Ciencias Técnicas y Aplicadas*, 6(3), 257–272. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.23857/dc.v6i3.1396>
- CEM MARS 6 Method Note Compendium. (2018).
- Chávez, Estrada, Gómez, Choque, Crespo, & Alvarez. (2013). *Potencial de cepas fúngicas aisladas en el área de Biotecnología Fúngica. Primera parte: Uso de hongos en biorremediación*. 1(1), 85–91. [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2310-02652013000100010](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2310-02652013000100010)
- Chen, Y., Huang, H., Ding, Y., Chen, W., Luo, J., Li, H., Wu, J., Chen, W., & Qi, S. (2019). Trace metals in aquatic environments of a mangrove ecosystem in Nansha, Guangzhou, South China: pollution status, sources, and ecological risk assessment. *Environmental Monitoring and Assessment*, 191(10), 629. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7732-5>
- Coello, J. (2011). *Aplicación del hongo Pleurotus ostreatus como alternativa para la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados* .
- Crawford, R. L., & Rosenberg, E. (2013). Bioremediation. In *The Prokaryotes* (pp. 295–307). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-31331-8\\_30](https://doi.org/10.1007/978-3-642-31331-8_30)
- Cubas, P. (2007). *Hongos* .
- Denkhaus, E., & Salnikow, K. (2002). Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 42(1), 35–56. [https://doi.org/10.1016/S1040-8428\(01\)00214-1](https://doi.org/10.1016/S1040-8428(01)00214-1)
- Dwivedi, S., Mishra, A., & Saini, D. (2012). Removal of Heavy Metals in Liquid Media through Fungi Isolated from Waste Water. In *International Journal of Science and Research* (Vol. 1). [www.ijsr.net](http://www.ijsr.net)
- EPA 3051. (2018). *Microwave Assisted Acid Digestion Of Sediments, Sludges, Soils, And Oils* *Microwave Assisted Acid Digestion Of Sediments, Sludges, Soils, And Oils*.
- Esaú López-Jácome, L., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C. A., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., & Franco-Cendejas, R. (2014). *Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología*. [www.medigraphic.org.mx](http://www.medigraphic.org.mx)

- Fernández-Cadena, J., Andrade, S., Silva-Coello, C. L., & De la Iglesia, R. (2014). Heavy metal concentration in mangrove surface sediments from the north-west coast of South America. *Marine Pollution Bulletin*, 82(1–2), 221–226. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.03.016>
- Fu, Z., & Xi, S. (2020). The effects of heavy metals on human metabolism. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 30(3), 167–176. <https://doi.org/10.1080/15376516.2019.1701594>
- Gad, S. C. (2024). Nickel and nickel compounds. In *Encyclopedia of Toxicology* (pp. 763–770). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824315-2.00520-0>
- González, C. (2005). RECUPERACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON METALES PESADOS UTILIZANDO PLANTAS Y MICROORGANISMOS RIZOSFÉRICOS. *Terra Latinoamericana*, 23(1), 29–37. <https://www.redalyc.org/pdf/573/57323104.pdf>
- Guarco, K. (2015). *Tratamiento del Sedimento Marino del Ramal B del Estero Salado de Guayaquil, por el Método “Soil-Washing”, para la Remoción de Metales Pesados*. Escuela Superior Politécnica del Litoral .
- Guo, H., Liu, H., Jian, Z., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., Zhao, L., He, R., & Tang, H. (2020). Immunotoxicity of nickel: Pathological and toxicological effects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 203, 111006. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111006>
- Hamai, H., Abou-Saleh, H., A. Al-Ghouti, M., Crovella, S., Saadaoui, I., & Soubra, L. (2024). Microalgae potential to protect from heavy metals-induced carcinogenicity. *Algal Research*, 78, 103411. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2024.103411>
- Helmestine, A. (2021, August 12). *Datos del cobre: propiedades químicas y físicas*.
- Herrera, Bethancourt, Von Chong, Mejía, Hernández, & Carrasco. (2022). Aislamiento e identificación de hongos con capacidad entomopatógena en el cultivo de yuca contra el chinche *Cyrtomenus bergi*, Froeschner (Cydnidae) en las provincias de Coclé y Herrera. *Revista Científica Semilla Del Este*, 3(1).
- Hong, J., Park, J. Y., & Gadd, G. M. (2009). Pyrene degradation and copper and zinc uptake by *Fusarium solani* and *Hypocrea lixii* isolated from petrol station soil. *Journal of Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04613.x>
- Hong, S.-B., Kim, D.-H., Park, I.-C., Samson, R. A., & Shin, H.-D. (2010). Isolation and Identification of *Aspergillus* Section *Fumigati* Strains from Arable Soil in Korea. *Mycobiology*, 38(1), 1. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2010.38.1.001>
- Jiménez Heinert, M. E., Grijalva Endara, A. de las M., & Ponce Solórzano, H. X. (2020). Plasma acoplado inductivamente en espectroscopia de emisión óptica (ICP-OES). *RECIMUNDO*, 4(4), 4–12. [https://doi.org/10.26820/recimundo/4.\(4\).octubre.2020.4-12](https://doi.org/10.26820/recimundo/4.(4).octubre.2020.4-12)
- Kaur, L., Dhanda, S., Sodhi, H. S., Kapoor, S., & Khanna, P. K. (2011). Storage and Preservation of Temperate Mushroom Cultures, *Agaricus Bisporus* and *Pleurotus Florida*. *Indian Journal of Microbiology*, 51(2), 234–238. <https://doi.org/10.1007/s12088-011-0152-z>

- Khan, S. R., Sharma, B., Chawla, P. A., & Bhatia, R. (2022). Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES): a Powerful Analytical Technique for Elemental Analysis. *Food Analytical Methods*, 15(3), 666–688.  
<https://doi.org/10.1007/s12161-021-02148-4>
- Li, K., Wang, C., Hu, H., & Zhang, Q. (2023). Selective removal of copper from heavy-metals-containing acidic solution by a mechanochemical reduction with zero-valent silicon. *Chemical Engineering Journal*, 466, 143246.  
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.143246>
- Londoño Franco, L. F., Londoño Muñoz, P. T., & Muñoz Garcia, F. G. (2016). LOS RIESGOS DE LOS METALES PESADOS EN LA SALUD HUMANA Y ANIMAL. *Biotechnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(2), 145.  
[https://doi.org/10.18684/BSAA\(14\)145-153](https://doi.org/10.18684/BSAA(14)145-153)
- López, Monks, S., Serrano, A., Flores, G., Gaytan, J., & López, M. (2012). Dinámica de las variables fisicoquímicas del sedimento de la laguna de Tampamachoco, Veracruz, México Dynamics of sediment physic-chemical variables of Lake Tampamachoco, Veracruz, Mexico. In *Revista Científica UDO Agrícola* (Vol. 12, Issue 4).
- Luna, Lozada, & Trigo. (2010). Aislamiento de cepas de *Aspergillus niger*, productoras de ocratoxina A, en café verde (*Coffea arabica*) almacenado. *Revista Mexicana de Micología*, 32.
- Mahurpawar, M. (2015a). EFFECTS OF HEAVY METALS ON HUMAN HEALTH. *International Journal of Research - GRANTHAALAYAH*.
- Mahurpawar, M. (2015b). EFFECTS OF HEAVY METALS ON HUMAN HEALTH. *International Journal of Research -GRANTHAALAYAH*, 3(9SE), 1–7.  
<https://doi.org/10.29121/granthaalayah.v3.i9SE.2015.3282>
- Mejía, G. (2006). Aproximación teórica a la biosorción de metales pesados por medio de microorganismos. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 1(1), 77–99.  
<https://www.redalyc.org/pdf/3214/321428096010.pdf>
- Ministerio del Ambiente. (2012, August 17). *Listado de industrias con descargas al Estero Salado*.  
<https://Www.Ambiente.Gob.Ec/?S=Listado+de+industrias+con+descargas+al+Estero+Salado>.
- Mohamadhasani, F., & Rahimi, M. (2022). Growth response and mycoremediation of heavy metals by fungus *Pleurotus* sp. *Scientific Reports*, 12(1), 19947.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-24349-5>
- Monserrate, L., Francisco Medina, J., Calle, P., de Ingeniería Marítima, F., Biológicas, C., & Recursos Naturales, O. (2009). *Estudio de Condiciones Físicas, Químicas y Biológicas en la Zona Intermareal de Dos Sectores del Estero Salado con Diferente Desarrollo Urbano*.

- Nelson, P. E., Dignani, M. C., & Anaissie, E. J. (1994). Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 7, Issue 4, pp. 479–504). American Society for Microbiology. <https://doi.org/10.1128/CMR.7.4.479>
- Núñez, W. E., Sotomayor, D. A., Ballardo, C. V., & Herrera, E. (2023). Fungal biomass potential: production and bioremediation mechanisms of heavy metals from municipal organic solid waste compost. *Scientia Agropecuaria*, *14*(1), 79–91. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2023.008>
- Olivares Arias, V., Valverde Som, L., Quiros Rodríguez, V., García Romero, R., Muñoz, N., Navarro Alarcón, M., & Cabrera Vique, C. (2015). Níquel en alimentos y factores influyentes en sus niveles, ingesta, biodisponibilidad y toxicidad: una revisión. *CyTA - Journal of Food*, *13*(1), 87–101. <https://doi.org/10.1080/19476337.2014.917383>
- Pabón, S., Benítez Benítez, R., Sarria Villa, R. A., & Gallo Corredor, J. A. (2020). Contaminación del agua por metales pesados, métodos de análisis y tecnologías de remoción. Una revisión. *Entre Ciencia e Ingeniería*, *14*(27), 9–18. <https://doi.org/10.31908/19098367.1734>
- Pan, R., Cao, L., & Zhang, R. (2009). Combined effects of Cu, Cd, Pb, and Zn on the growth and uptake of consortium of Cu-resistant *Penicillium* sp. A1 and Cd-resistant *Fusarium* sp. A19. *Journal of Hazardous Materials*, *171*(1–3), 761–766. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.06.080>
- Pernía, B., Mero, M., Cornejo, X., Ramírez-Prado, N., Ramírez, L., Bravo, K., López, D., Muñoz, J., & Zambrano, J. (2018). 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, B., Rojas-Tortolero, D., Sena, L., de Sisto, A., Inojosa, Y., & Naranjo, L. (2018). FITOTOXICIDAD DE HAP, CRUDOS EXTRA PESADOS Y SUS FRACCIONES EN *Lactuca sativa*: UNA INTERPRETACIÓN INTEGRAL UTILIZANDO UN ÍNDICE DE TOXICIDAD MODIFICADO. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, *34*(1), 79–91. <https://doi.org/10.20937/RICA.2018.34.01.07>
- Pernía, Mero, Cornejo, & Zambrano. (2019). Impactos de la Contaminación Sobre los Manglares de Ecuador. *Research Gate*. [https://www.researchgate.net/publication/337424161\\_IMPACTOS\\_DE\\_LA\\_CONTAMINACION\\_SOBRE\\_LOS\\_MANGLARES\\_DE\\_ECUADOR](https://www.researchgate.net/publication/337424161_IMPACTOS_DE_LA_CONTAMINACION_SOBRE_LOS_MANGLARES_DE_ECUADOR)
- Poveda, & Avilés. (2018). Situación de los manglares de la ciudad de Guayaquil - provincia del Guayas - Ecuador. *Revista DELOS Desarrollo Local Sostenible*, *31*.
- Pu, H., Yuan, Y., Qin, L., & Liu, X. (2023). pH Drives Differences in Bacterial Community  $\beta$ -Diversity in Hydrologically Connected Lake Sediments. *Microorganisms*, *11*(3). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030676>
- Rebolledo Monsalve, E., & Verduga Vergara, L. (2023). Water and Sediment Quality Changes in Mangrove Systems with Shrimp Farms in the Northern Ecuadorean Coast. *Applied Sciences*, *13*(13), 7749. <https://doi.org/10.3390/app13137749>
- Rodríguez, D. (2017). Intoxicación ocupacional por metales pesados. *Medisan*, *21*(12).

- Rodríguez, Villeda, Vázquez, Bejarado, Cruz, Olguín, Villela, & Flores. (2018). *MÉTODOS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LOS MANGLARES MEXICANOS* (1st ed.).
- Rojas Mosquera, M. N., & Rojas Criollo, D. A. (2019a, June). El Estero Salado en el desarrollo urbano de Guayaquil: crónicas de un recurso natural en decadencia. *XI Seminario Internacional de Investigación En Urbanismo, Barcelona-Santiago de Chile, Junio 2019*. <https://doi.org/10.5821/siiu.6590>
- Rojas Mosquera, M. N., & Rojas Criollo, D. A. (2019b, June). El Estero Salado en el desarrollo urbano de Guayaquil: crónicas de un recurso natural en decadencia. *XI Seminario Internacional de Investigación En Urbanismo, Barcelona-Santiago de Chile, Junio 2019*. <https://doi.org/10.5821/siiu.6590>
- Romero, & Bustamante. (2023). *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*.
- Royer, A., & Sharman, T. (2024). *Copper Toxicity*.
- Sánchez, & Almaguer. (2014). Aeromicología y salud humana. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 66(3).
- Sánchez, Servín, & Villalpando. (2022, May 9). *Metales pesados: los enemigos invisibles que están por todas partes*. <https://ciencia.unam.mx/leer/1261/metales-pesados-los-enemigos-invisibles-que-estan-por-todas-partes>
- Saremi, H., & Saremi, H. (2013). Isolation of the most common Fusarium species and the effect of soil solarisation on main pathogenic species in different climatic zones of Iran. *European Journal of Plant Pathology*, 137(3), 585–596. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0272-x>
- Sepúlveda, T., Velásco, & Pérez. (2005). *Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación*.
- Sharma, B., & Shukla, P. (2022). Futuristic avenues of metabolic engineering techniques in bioremediation. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(1), 51–60. <https://doi.org/10.1002/bab.2080>
- Singh, P. C., Srivastava, S., Shukla, D., Bist, V., Tripathi, P., Anand, V., Arkvanshi, S. K., Kaur, J., & Srivastava, S. (2018). *Mycoremediation Mechanisms for Heavy Metal Resistance/Tolerance in Plants* (pp. 351–381). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-77386-5\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-319-77386-5_14)
- Tapia Núñez. (2015). *Norma Técnica Ambiental Ecuatoriana Acuerdo Ministerial No. 28*. Ministerio del Ambiente.
- Torres, J. R., Barba, E., & Choix, F. J. (2018). Mangrove Productivity and Phenology in Relation to Hydroperiod and Physical–Chemistry Properties of Water and Sediment in Biosphere Reserve, Centla Wetland, Mexico. *Tropical Conservation Science*, 11, 194008291880518. <https://doi.org/10.1177/1940082918805188>
- Torres, & Palacios. (2007). Calidad ambiental del bloom algal en área urbana del Estero Salado (Ciudad de Guayaquil) en junio 2005. *Acta Oceanográfica Del Pacífico*, 14(1).

- Torres, Sánchez, Choix, Márquez, Alcudia, & Barrios. (2023). Variación físico-química en agua y sedimento del manglar en tres lagunas costeras del Golfo de California. *Áreas Naturales Protegidas Scripta*, 3(3), 61–83.
- Triana. (2016). *Estandarización del inoculo de Aspergillus brasiliensis para su uso en pruebas de control de calidad y validación de análisis de mohos en el laboratorio microbiológico de Barranquilla*.
- Văcar, C. L., Covaci, E., Chakraborty, S., Li, B., Weindorf, D. C., Frențiu, T., Pârvu, M., & Podar, D. (2021). Heavy Metal-Resistant Filamentous Fungi as Potential Mercury Bioremediators. *Journal of Fungi*, 7(5), 386. <https://doi.org/10.3390/jof7050386>
- Valenzuela, Solis, Martínez, & Pinochet. (2006). Hongos aislados desde suelos contaminados con petróleo. *Boletín Micológico*, 21, 35–41.
- Vargas. (2015). *EVALUACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN FÍSICO – QUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE LAS AGUAS Y SEDIMENTOS DEL ESTERO SALADO, SECTOR NORTE DE LA CIUDAD DE GUAYAQUIL- ECUADOR*.
- Vélez. (2015). *Análisis del Impacto social que tiene la contaminación del Estero Salado y su repercusión en la salud y el medio ambiente en la ciudadela La Chala, ubicado al Sur Oeste de la Ciudad de Guayaquil*.
- Victorava, & Feoktistova. (2018). El metabolismo del cobre. Sus consecuencias para la salud humana. *Medisur*, 16(4). <http://scielo.sld.cu/pdf/ms/v16n4/ms13416.pdf>
- Villalba-Villalba, A. G., Chan-Chan, L. H., & Maldonado-Arce, A. (2022). Toxic metal tolerance of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus nidulans* isolated from tailings. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 28(2), 189–205. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2021.02.009>
- Watanabe, T. (2010). *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi* (3rd ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/EBK1439804193>
- Zavaleta De la Cruz, L., Ñique Alvarez, M., & Lévano Crisóstomo, J. (2021a). CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS SEDIMENTOS DEL HUMEDAL LAGUNA BELLA EN LA SELVA DE HUÁNUCO, PERÚ. *Ecología Aplicada*, 20(2), 161–167. <https://doi.org/10.21704/rea.v20i2.1806>
- Zavaleta De la Cruz, L., Ñique Alvarez, M., & Lévano Crisóstomo, J. (2021b). CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE LOS SEDIMENTOS DEL HUMEDAL LAGUNA BELLA EN LA SELVA DE HUÁNUCO, PERÚ. *Ecología Aplicada*, 20(2), 161–167. <https://doi.org/10.21704/rea.v20i2.1806>
- Žvab, U., Kukulin, D. S., Fanetti, M., & Valant, M. (2021). Bioremediation of copper polluted wastewater-like nutrient media and simultaneous synthesis of stable copper nanoparticles by a viable green alga. *Journal of Water Process Engineering*, 42, 102123. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.102123>

## Anexos

### *Anexo 1 Escombros y desperdicios hallados cerca del Estero Salado.*



### *Anexo 2 Procesamiento de las muestras de sedimento.*



### *Anexo 3 Criterios de remediación (valores máximos permisibles) Normativa Ambiental Ecuatoriana*

Parámetro	Unidades	USO DEL SUELO			
		Residencial	Comercial	Industria I	Agrícola
<b>Parámetros Generales</b>					
Conductividad	uS/mm	200	400	400	200
pH	-	6a8	6a8	6a8	6a8
<b>Parámetros inorgánicos</b>					

Arsénico (inorgánico)	mg/kg	<b>12</b>	<b>12</b>	<b>12</b>	<b>12</b>
Sulfuro	mg/kg	-	-	-	500
Bario	mg/kg	500	2000	2000	750
Boro (soluble en agua caliente)	mg/kg	-	-	-	2
Cadmio	mg/kg	4	10	10	2
Cobalto	mg/kg	50	300	300	40
Cobre	mg/kg	63	91	91	91
Cromo Total	mg/kg	64	87	87	65
Cromo VI	mg/kg	0.4	1.4	1.4	0.4
Cianuro (libre)	mg/kg	0.9	8	8	0.9
Estaño	mg/kg	50	300	300	5
Fluoruros	mg/kg	400	2000	2000	200
Mercurio	mg/kg	1	10	10	0.8
Molibdeno	mg/kg	5	40	40	5
Níquel	mg/kg	100	100	50	50
Plomo	mg/kg	140	150	150	60
Selenio	mg/kg	5	10	10	2
Talio	mg/kg	1	1	1	1
Vanadio	mg/kg	130	130	130	130
Zinc	mg/kg	200	380	360	200

*Anexo 4 Criterios de calidad de suelo (valores máximos permisibles) Normativa Ambiental Canadiense*

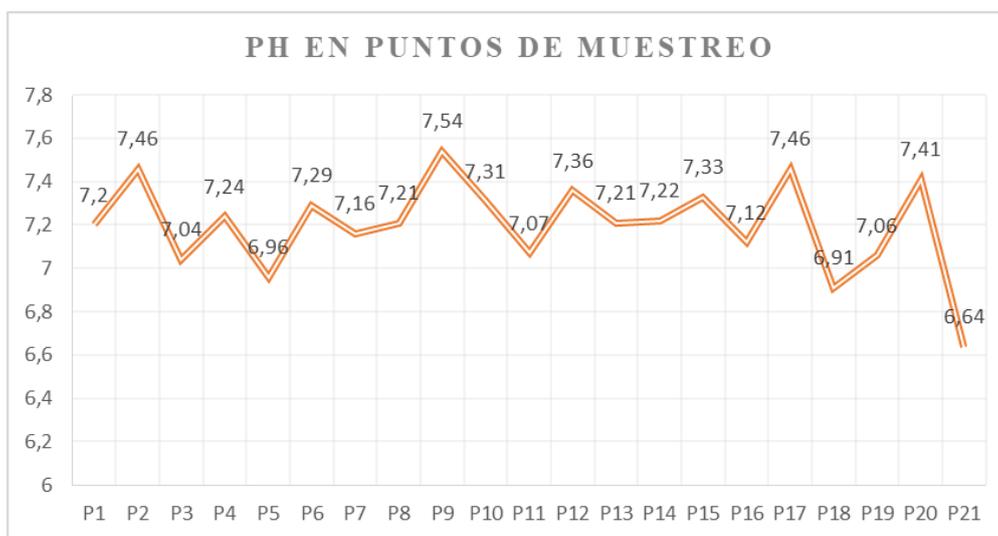
Chemical Name	Chemical Groups	Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health				
		Concentration (mg/kg dry weight) Agricultural	Concentration (mg/kg dry weight) Residential/ parkland	Concentration (mg/kg dry weight) Commercial	Concentration (mg/kg dry weight) Industrial	Date
		<a href="#">Copper</a> CASRN <a href="#">7440-50-8</a>	Inorganic, Metals	<a href="#">63</a>	<a href="#">63</a>	<a href="#">91</a>
<a href="#">Nickel</a> CASRN <a href="#">7440-02-0</a>	Inorganic, Metals	<a href="#">45</a>	<a href="#">45</a>	<a href="#">89</a>	<a href="#">89</a>	<a href="#">2015</a>
<a href="#">pH</a> CASRN <i>No data</i>	Inorganic, Acidity, alkalinity and ph	<a href="#">6 to 8</a>	<a href="#">6 to 8</a>	<a href="#">6 to 8</a>	<a href="#">6 to 8</a>	<a href="#">1991</a>

*Anexo 5 Parámetros fisicoquímicos obtenidos en los puntos de muestreo.*

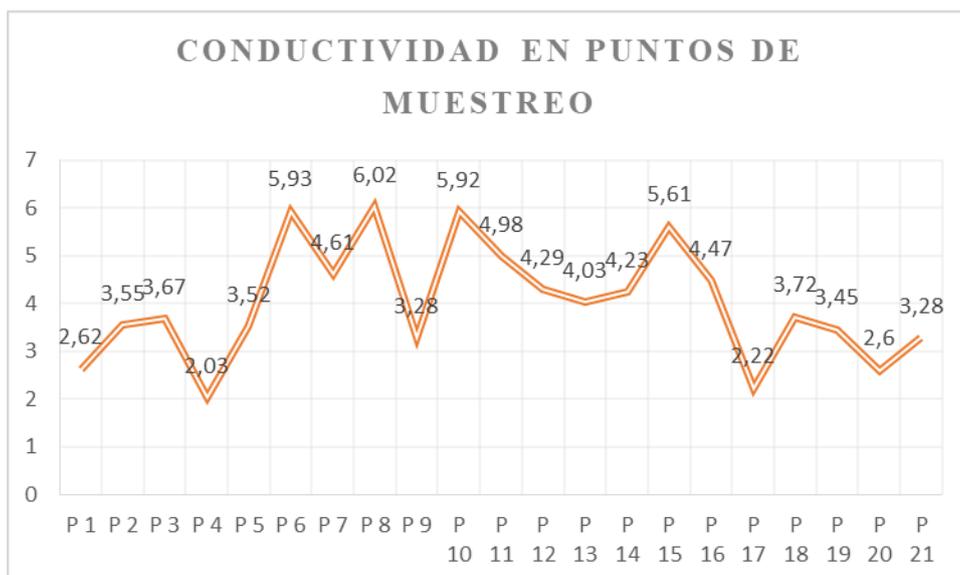
Punto de muestra	pH	CND	% Humedad
P 1	7.20	2,62	59,50
P 2	7.46	3,55	44

P 3	7,04	3.67	36,80
P 4	7.24	2,03	29,10
P 5	6.96	3.52	46,4
P 6	7.29	5.93	62,8
P 7	7.16	4.61	64,1
P 8	7.21	6,02	64,9
P 9	7.54	3,28	32,3
P 10	7.31	5,92	58,9
P 11	7,07	4,98	73,2
P 12	7.36	4,29	64,1
P 13	7.21	4,03	59,5
P 14	7.22	4,23	61,9
P 15	7.33	5,61	62,9
P 16	7.12	4,47	60,5
P 17	7.46	2,22	18,5
P 18	6.91	3,72	57,7
P 19	7,06	3,45	68,6
P 20	7.41	2,6	52,3
P 21	6.64	3,28	56,2

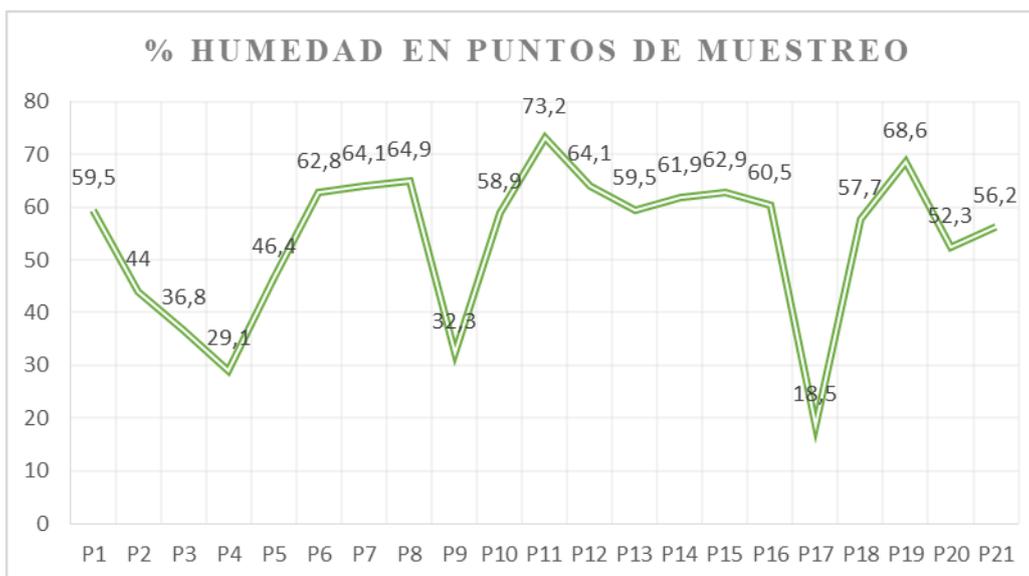
**Anexo 6 Gráfica de variaciones de pH por puntos muestreados.**



**Anexo 7 Gráfica de variaciones de conductividad por puntos muestreados.**



**Anexo 8 Gráfica de variaciones de contenido de humedad por puntos de muestreo.**

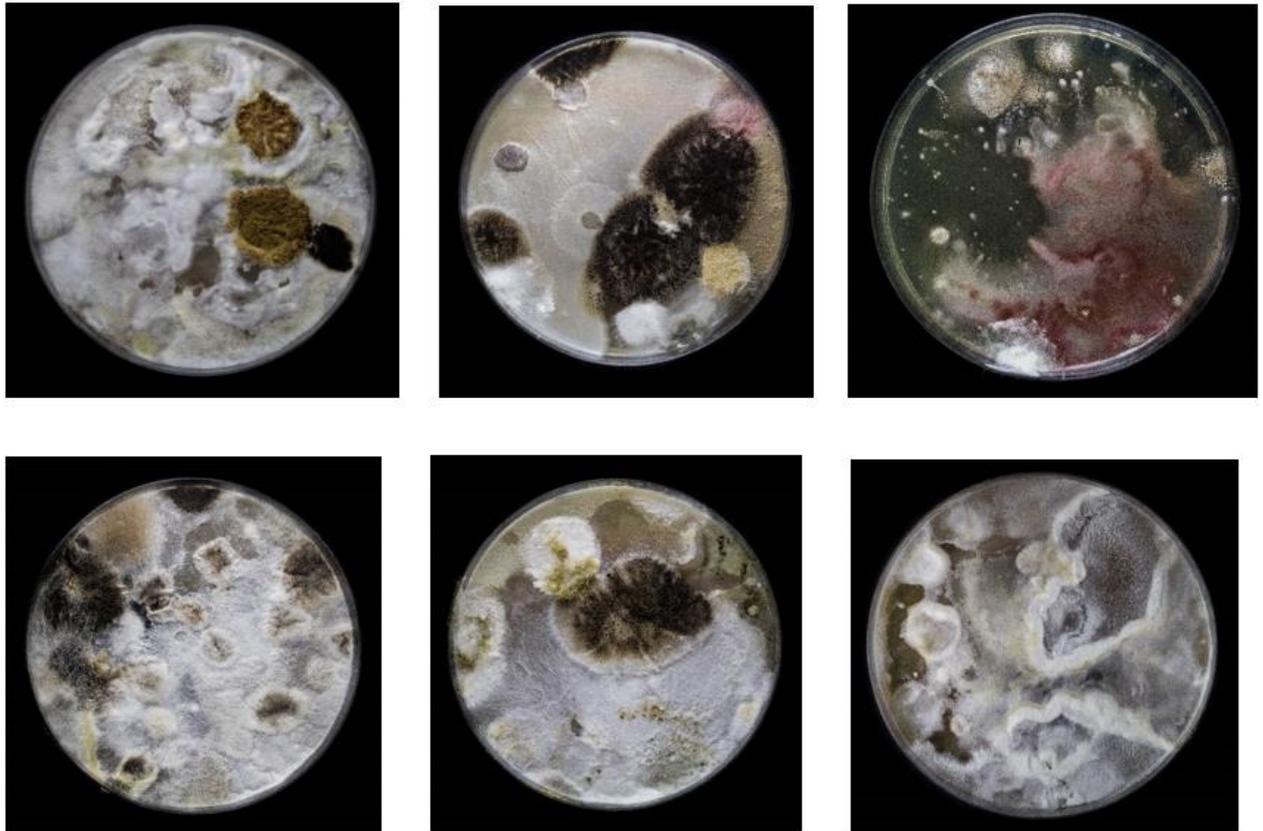


**Anexo 9 Resumen de coordenadas separadas en zonas muestreadas del Estero Salado.**

Zonas	Puntos de muestreo	Coordenada
Zona 1	P1 (Malecón Miraflores)	2°09'52"S 79°55'04"W
	P2 (Parque Miraflores)	2°09'55"S 79°54'58"W
	P3 (C.C Alban Borja)	2°10'07"S 79°54'54"W
	P4 (C.C Aventura plaza)	2°10'22"S 79°54'46"W
	P5 (Bellavista)	2°10'27"S 79°54'39"W
Zona 2	P6 (Parque lineal Bellavista)	2°11'20"S 79°54'37"W

	P7 (Parque lineal del Salado)	2°11'18"S 79°54'25"W
	P8 (Museo municipal del arte)	2°11'18"S 79°54'22"W
	P9 (Parque lineal “El Pescador”)	2°11'18"S 79°54'18"W
	P10 (Parque lineal “El Pescador”)	2°11'18"S 79°54'16"W
Zona 3	P11 (Puente del Velero)	2°11'18"S 79°54'01"W
	P12 (Puente 5 de junio)	2°11'12"S 79°53'59"W
	P13 (Parque Lineal Estero Salado)	2°11'05"S 79°53'57"W
	P14 (Parque Lineal)	2°11'01"S 79°54'02"W
	P15 (Parque Lineal Estero Salado)	2°10'56"S 79°54'04"W
	P16 (Parque Lineal Estero Salado)	2°10'53"S 79°54'06"W
Zona 4	P17 (Puente plaza Dañin)	2°10'05"S 79°54'06"W
	P18 (Parque lineal Kennedy Norte)	2°09'50"S 79°54'07"W
	P19 (Parque lineal Kennedy Norte)	2°09'43"S 79°54'07"W
	P20 (Parque lineal Kennedy Norte)	2°09'35"S 79°54'09"
	P21 (Puente Ecológico)	2°09'26"S 79°54'10"W

*Anexo 10 Parte de los crecimientos de colonias en a partir de solución madre de puntos de muestreo*



*Anexo 11 Aislamiento de Fusarium sp. y Aspergillus sp. en medio PDA y SDA.*

Medios de cultivo	Cara frontal
PDA	
SDA	



Anexo 12. Caracterización morfológica según fuentes bibliográficas.

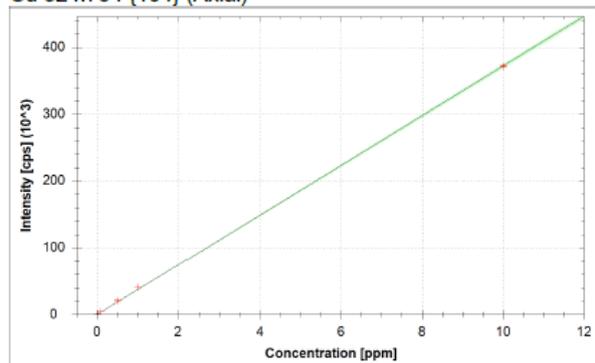
<b>Forma de estructuras de esporas según</b>	
<i>Aspergillus sp.</i> (Barnett & Hunter, 1986)	<i>Fusarium sp.</i> (Nelson et al., 1994)

Anexo 13 Observación de esporas en cámara de Neubauer.



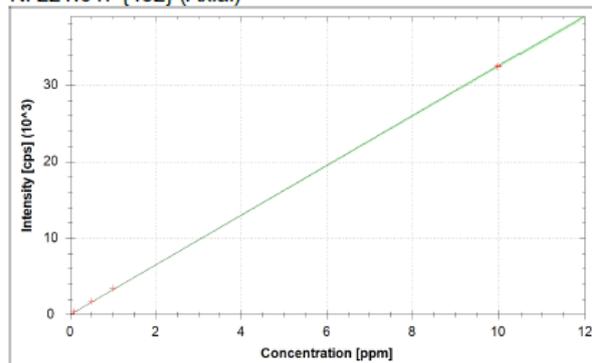
### Anexo 14 Curvas de calibración Cobre y Níquel de ICP-OES

Cu 324.754 {104} (Axial)



$f(x) = 37201.3097 \cdot x + 240.7792$   
 $R^2 = 0.9998$   
 BEC = 0.006 ppm  
 LoD = 0.0004 ppm

Ni 221.647 {452} (Axial)

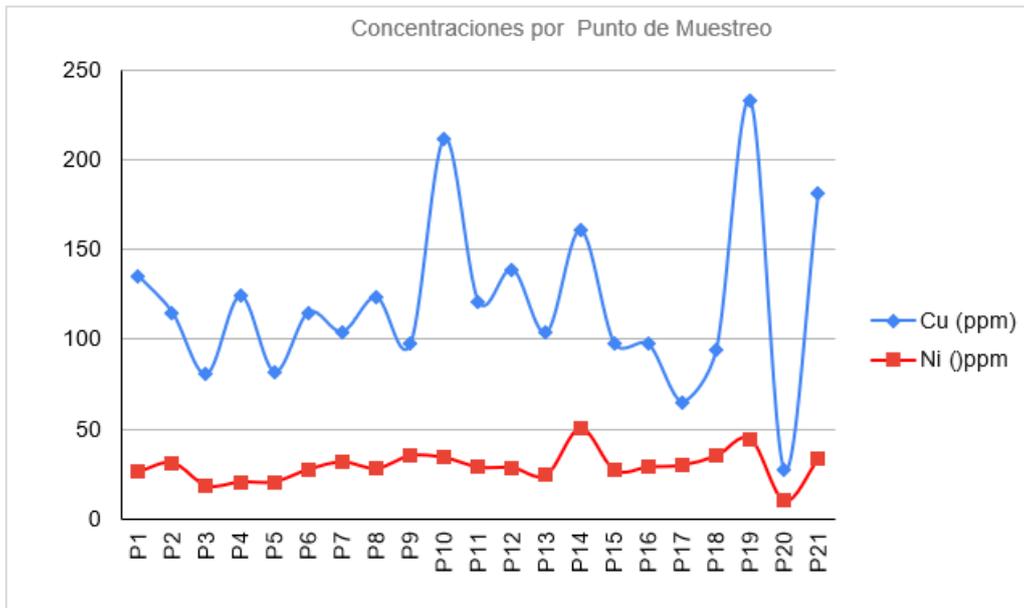


$f(x) = 3253.0408 \cdot x + -2.5150$   
 $R^2 = 0.9999$   
 BEC = -0.001 ppm  
 LoD = 0.0005 ppm

### Anexo 15. Concentraciones generales de Cobre y Níquel en muestras de sedimento procedentes del Estero Salado.

	Cu (ppm)	Ni (ppm)
P1	135.3	26.2
P2	114.7	31.1
P3	80.4	18.4
P4	124.1	20.5
P5	81.7	20.6
P6	114.9	27.5
P7	104.1	31.6
P8	123.3	28
P9	97.3	35.1
P10	212	34
P11	121	28.7
P12	139	28.4
P13	103.6	24.3
P14	160.8	50.3
P15	97.6	27.1
P16	97.3	28.8
P17	65.1	29.8
P18	94.3	35
P19	232.9	44.4
P20	27.1	10
P21	181.7	33.2

**Anexo 16 Gráfica de concentraciones generales de metales pesados en los sedimentos del Estero Salado.**



**Anexo 17 Valores de lectura de metales en suelo (Cu y Ni) en ICP-OES**

Cu 324.754 {104} (Axial)	Ni 221.647 {452} (Axial)	Cu 324.754 {104} (Axial)	Ni 221.647 {452} (Axial)
1.353 ppm	0.262 ppm	1.147 ppm	0.311 ppm
1.353 ppm	0.262 ppm	1.147 ppm	0.311 ppm
N/A	N/A	N/A	N/A
Cu 324.754 {104} (Axial)	Ni 221.647 {452} (Axial)	Cu 324.754 {104} (Axial)	Ni 221.647 {452} (Axial)
0.804 ppm	0.184 ppm	1.241 ppm	0.205 ppm
0.804 ppm	0.184 ppm	1.241 ppm	0.205 ppm
N/A	N/A	N/A	N/A
Cu 324.754 {104} (Axial)	Ni 221.647 {452} (Axial)	Cu 324.754 {104} (Axial)	Ni 221.647 {452} (Axial)
0.817 ppm	0.206 ppm	1.149 ppm	0.275 ppm
0.817 ppm	0.206 ppm	1.149 ppm	0.275 ppm
N/A	N/A	N/A	N/A
Cu 324.754 {104} (Axial)	Ni 221.647 {452} (Axial)	Cu 324.754 {104} (Axial)	Ni 221.647 {452} (Axial)
1.014 ppm	0.316 ppm	1.233 ppm	0.280 ppm
1.014 ppm	0.316 ppm	1.233 ppm	0.280 ppm
N/A	N/A	N/A	N/A
Cu 324.754 {104} (Axial)	Ni 221.647 {452} (Axial)	Cu 324.754 {104} (Axial)	Ni 221.647 {452} (Axial)
0.973 ppm	0.251 ppm	2.120 ppm	0.340 ppm
0.973 ppm	0.251 ppm	2.120 ppm	0.340 ppm
N/A	N/A	N/A	N/A
Cu 324.754 {104} (Axial)	Ni 221.647 {452} (Axial)	Cu 324.754 {104} (Axial)	Ni 221.647 {452} (Axial)
1.210 ppm	0.287 ppm	1.390 ppm	0.284 ppm
1.210 ppm	0.287 ppm	1.390 ppm	0.284 ppm
N/A	N/A	N/A	N/A

Cu 324.754 {104} (Axial)	Ni 221.647 {452} (Axial)	Cu 324.754 {104} (Axial)	Ni 221.647 {452} (Axial)
1.036 ppm	0.243 ppm	1.608 ppm	0.503 ppm
1.036 ppm	0.243 ppm	1.608 ppm	0.503 ppm
N/A	N/A	N/A	N/A

Cu 324.754 {104} (Axial)	Ni 221.647 {452} (Axial)	Cu 324.754 {104} (Axial)	Ni 221.647 {452} (Axial)
0.976 ppm	0.271 ppm	0.973 ppm	0.288 ppm
0.976 ppm	0.271 ppm	0.973 ppm	0.288 ppm
N/A	N/A	N/A	N/A

Ni 221.647 {452} (Axial)	Cu 324.754 {104} (Axial)	Cu 324.754 {104} (Axial)	Ni 221.647 {452} (Axial)
0.298 ppm	0.651 ppm	0.943 ppm	0.350 ppm
0.298 ppm	0.651 ppm	0.943 ppm	0.350 ppm
N/A	N/A	N/A	N/A

Cu 324.754 {104} (Axial)	Ni 221.647 {452} (Axial)	Cu 324.754 {104} (Axial)	Ni 221.647 {452} (Axial)
2.329 ppm	0.444 ppm	0.271 ppm	0.100 ppm
2.329 ppm	0.444 ppm	0.271 ppm	0.100 ppm
N/A	N/A	N/A	N/A

Cu 324.754 {104} (Axial)	Ni 221.647 {452} (Axial)
1.187 ppm	0.332 ppm
1.187 ppm	0.332 ppm
N/A	N/A

**Nota:** La información completa de las lecturas del tratamiento de se encuentra en el repositorio del ICP ubicado en el laboratorio de la Universidad Politécnica Salesiana.