



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

**AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN
MOLECULAR DE BACTERIAS PROVENIENTES DE RELAVES
MINEROS DEL SECTOR SAN CARLOS DE LAS MINAS –
ZAMORA CHINCHIPE**

Trabajo de Titulación

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTOR: EDINSON MARCELO MEDINA BARRERA

DIRECTORA: ING. CRISTINA GABRIELA CALDERÓN TAPIA MSC.

Riobamba – Ecuador

2023

© 2023, Edinson Marcelo Medina Barrera

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

Yo, Edinson Marcelo Medina Barrera, declaro que el presente Trabajo de Titulación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autor asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Titulación; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 28 de febrero de 2023



Edinson Marcelo Medina Barrera

115009847-1

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El Trabajo de Titulación; tipo: Proyecto de Investigación, **AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS PROVENIENTES DE RELAVES MINEROS DEL SECTOR SAN CARLOS DE LAS MINAS – ZAMORA CHINCHIPE**, realizado por el señor: **EDINSON MARCELO MEDINA BARRERA**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Ing. Sofia Carolina Godoy Ponce Mgs. PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2023-02-28
Ing. Cristina Gabriela Calderón Tapia MsC. DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN		2023-02-28
Ing. Ana Rafaela Pacurucu Reyes MsC. ASESORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN		2023-02-28

DEDICATORIA

A todos aquellos que se atrevieron a soñar lejos de su zona de confort.

Edinson

AGRADECIMIENTO

Agradezco a mis padres, Rosario y Edison, por el apoyo incondicional desde el momento que decidí emprender este camino, por ser mi pilar fundamental y mi batería. A mis hermanos y familiares que, con un consejo, una idea, una salida, una risa o un mensaje me mantuvieron firme a continuar.

Agradezco a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por haberme acogido en sus aulas y permitirme esta maravillosa formación profesional.

A mi tutora, Ing. Cristina Calderón, por estar siempre dispuesta a brindarme una mano cuando no tenía rumbo y ser una guía completa en el desarrollo de este trabajo.

A la Ing. Rafaela Pacurucu, por la confianza depositada en mí, la paciencia y las enseñanzas dentro y fuera del aula de clases.

A mis amigas, Andrea y Angélica, que con una llamada me componían el día en un segundo.

Finalmente, quiero agradecerme por no haber desistido a pesar de perderme en un colapso.

Edinson

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT	xv
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	5
1.1. Minería metálica.....	5
1.1.1. Fases de la minería metálica.....	5
1.2. Minería en Ecuador	5
1.3. Efectos ambientales de la actividad minera	6
1.4. Consorcios bacterianos en relaves mineros.....	7
1.5. Métodos de aislamiento de microorganismos	8
1.5.1. Métodos Generales	8
1.5.1.1. <i>Estriado en placa</i>	8
1.5.1.2. <i>Vertido en placa</i>	9
1.5.1.3. <i>Extensión en superficie.....</i>	10
1.5.2. Métodos Especiales.....	11
1.5.2.1. <i>Calentamiento</i>	11
1.5.2.2. <i>Agregado de álcali o ácido</i>	11
1.5.2.3. <i>Variación de la temperatura de incubación.....</i>	11
1.5.2.4. <i>Cambios de pH.....</i>	11

1.5.2.5. <i>Presencia de sales o colorantes</i>	11
1.6. Caracterización molecular de microorganismos	12
1.6.1. Métodos basados en la restricción del ADN	12
1.6.1.1. <i>Análisis con endonucleasas de restricción de ADN plasmídico (REAP)</i>	12
1.6.1.2. <i>Análisis cromosómico con endonucleasas de restricción (REAC)</i>	12
1.6.1.3. <i>Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)</i>	13
1.6.2. Métodos basados en la amplificación de ácidos nucleicos	13
1.6.2.1. <i>Rep – PCR</i>	13
1.6.2.2. <i>PCR – RFLP</i>	14
1.6.2.3. <i>Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)</i>	14
1.6.2.4. <i>Polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP)</i>	14
1.6.2.5. <i>ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)</i>	15
1.6.2.6. <i>Dactiloscopia por amplificación directa (DAF)</i>	15
1.6.3. Métodos basados en la secuenciación de ADN	15
1.6.3.1. <i>Tipificación de secuencias multilocus (MLST)</i>	15
1.6.3.2. <i>Método SANGER</i>	16
1.7. Bioinformática en la identificación molecular de microorganismos	17
1.8. Biorremediación	18
1.9. Pruebas de degradación de contaminantes	18

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO	20
2.1. Tipo de investigación	20
2.2. Diseño de la investigación	20
2.3. Planteamiento de hipótesis	20
2.3.1. <i>Hipótesis alternativa</i>	20
2.3.2. <i>Hipótesis nula</i>	21

2.4. Etapas de la investigación	21
2.4.1. Fase I: Muestreo	21
2.4.1.1. <i>Localización del estudio</i>	21
2.4.1.2. <i>Población de estudio</i>	22
2.4.1.3. <i>Tamaño de la muestra</i>	22
2.4.1.4. <i>Método de muestreo</i>	23
2.4.2. Fase II: Análisis fisicoquímicos de muestras	23
2.4.2.1. <i>pH</i>	24
2.4.2.2. <i>Conductividad eléctrica</i>	24
2.4.2.3. <i>Humedad</i>	24
2.4.2.4. <i>Cianuro</i>	24
2.4.2.5. <i>Mercurio</i>	25
2.4.3. Fase III: Aislamiento y purificación de cepas bacterianas	26
2.4.3.1. <i>Análisis microbiológico</i>	26
2.4.3.2. <i>Aislamiento y purificación de cepas bacterianas</i>	27
2.4.4. Fase IV: Caracterización molecular de cepas bacterianas	27
2.4.4.1. <i>Caracterización molecular y secuenciación</i>	27
2.4.4.2. <i>Identificación de especies</i>	27
2.4.5. Fase V: Pruebas de degradación de contaminantes	27
2.4.5.1. <i>Degradación de Cianuro</i>	28
2.4.5.2. <i>Degradación de Mercurio</i>	28

CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
3.1. Fase I: Muestreo	29
3.2. Fase II: Análisis fisicoquímico de las muestras	30
3.2.1. pH	30

3.2.2. <i>Conductividad eléctrica (CE)</i>	30
3.2.3. <i>Cianuro</i>	31
3.2.4. <i>Mercurio</i>	32
3.3. Fase III: Aislamiento y purificación de cepas bacterianas	33
3.3.1. <i>Análisis microbiológico</i>	33
3.3.2. <i>Aislamiento y purificación de cepas</i>	34
3.4. Fase IV: Caracterización molecular de cepas bacterianas	39
3.4.1. <i>Caracterización molecular y secuenciación</i>	41
3.4.1.1. <i>Muestra E1: secuencia de ADN</i>	43
3.4.1.2. <i>Muestra E2: secuencia de ADN</i>	43
3.4.1.3. <i>Muestra E3: secuencia de ADN</i>	43
3.4.1.4. <i>Muestra E4: secuencia de ADN</i>	44
3.4.1.5. <i>Muestra E5: secuencia de ADN</i>	44
3.4.1.6. <i>Muestra E6: secuencia de ADN</i>	44
3.4.1.7. <i>Muestra E7: secuencia de ADN</i>	45
3.4.1.8. <i>Muestra E8: secuencia de ADN</i>	45
3.5. Fase V: Pruebas de degradación de contaminantes	47
3.5.1. <i>Pruebas de degradación en medio con cianuro</i>	49
3.5.2. <i>Pruebas en medio con mercurio</i>	57
CONCLUSIONES	65
RECOMENDACIONES	67
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2: Localización del área de estudio.....	21
Tabla 1-3: Determinación inicial de pH.....	30
Tabla 2-3: Determinación inicial de conductividad eléctrica	31
Tabla 3-3: Determinación inicial de cianuro.....	31
Tabla 4-3: Cálculos obtenidos tras la transformación de unidades en la determinación de cianuro	32
Tabla 5-3: Determinación inicial de mercurio	33
Tabla 6-3: Análisis microbiológico y conteo de colonias bacterianas	33
Tabla 7-3: Segundo ciclo de aislamiento y purificación de cepas bacterianas	35
Tabla 8-3: Tercer ciclo de aislamiento y purificación de cepas bacterianas	35
Tabla 9-3: Caracterización morfológica de cepas bacterianas	36
Tabla 10-3: Cepas bacterianas seleccionadas para caracterización molecular.....	37
Tabla 11-3: Tinción Gram.....	39
Tabla 12-3: Pruebas de movilidad bacteriana	40
Tabla 13-3: Identificación de cepas bacterianas en el software Blast by NCBI	46
Tabla 14-3: Escala de McFarland	47
Tabla 15-3: Densidad celular en medio con cianuro.....	49
Tabla 16-3: Porcentaje de degradación de cianuro	52
Tabla 17-3: Densidad celular en medio con mercurio	57
Tabla 18-3: Porcentajes de degradación en medio con mercurio	60

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1-1: Aislamiento por estriado en placa.....	9
Ilustración 2-1: Preparación de diluciones seriadas	10
Ilustración 3-1: Aislamiento por vertido en placa	10
Ilustración 4-1: Aislamiento por extensión en placa	10
Ilustración 5-1: Método SANGER. a) Síntesis de ADN con adición de dNTPs y un ddNTP final que termina la reacción. b) Electroforesis capilar y detección de fragmentos. c) Electroferograma de la secuencia de ADN.	16
Ilustración 1-2: Mapa de ubicación de la zona de muestreo.....	22
Ilustración 1-3: Superficie del relave minero muestreado.....	29
Ilustración 2-3: Proceso de recolección de muestras.....	29
Ilustración 3-3: Crecimiento bacteriano heterogéneo en cajas Petri. a) M1, 10^{-2} y b) M2, 10^{-1}	34
Ilustración 4-3: Cepas bacterianas para caracterización molecular. a) E1, b) E2, c) E3, d) E4, e) E5 y f) E6	38
Ilustración 5-3: Cepas bacterianas para caracterización molecular. a) E7 y b) E8.....	39
Ilustración 6-3: Tinción Gram. a) Bacilos gramnegativos (E1), b) Estafilococos grampositivos (E5) y c) Bacilos grampositivos (E3).	40
Ilustración 7-3: Prueba de movilidad positiva en E1, E2, E3, E7 y E8 (de derecha a izquierda).	41
Ilustración 8-3: Resultados de la electroforesis para los amplicones obtenidos con los primers 27F/1492R para 6 de las muestras. *MM: Marcador de peso molecular ABM 100pb plus opti DNA maker	42
Ilustración 9-3: Resultados de la electroforesis para los amplicones obtenidos con los primers rpoB-F/rpoB-R para la muestra E3. *MM: Marcador de peso molecular ABM 100pb plus opti DNA maker	42
Ilustración 10-3: Curva de calibración de la escala de McFarland.....	48
Ilustración 11-3: Estándares de la escala de McFarland	48
Ilustración 12-3: Determinación de cianuro en pruebas de degradación. De izquierda a derecha: blanco C1; blanco C2; blanco C3; muestra C1, E2; muestra C2, E2; y muestra C3, E2.	55
Ilustración 13-3: Rutas enzimáticas para la biodegradación de cianuro y ciano-derivados.	56
Ilustración 14-3: Caldo nutritivo digerido para análisis de mercurio por espectrofotometría de absorción atómica (24 muestras de la repetición R1).....	63
Ilustración 15-3: Genes <i>mer</i> que determinan la resistencia al mercurio en bacterias.....	64

ÍNDICE DE ANEXOS

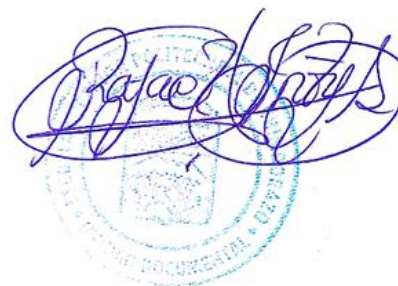
**ANEXO A: INFORME DE LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS
BACTERIANAS**

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue el aislamiento, caracterización e identificación molecular de cepas bacterianas provenientes de un relave minero del sector San Carlos de las Minas – Zamora Chinchipe, con el fin de evaluar el posible potencial biodegradador frente a concentraciones de mercurio (Hg) y cianuro (CN⁻). El aislamiento de cepas bacterianas se llevó a cabo en agar nutritivo mediante siembra por estriado, se estudió la morfología celular basados en pruebas macroscópicas, de tinción diferencial y movilidad. Se realizó la caracterización molecular partiendo con la extracción de ADN mediante métodos convencionales, análisis de calidad por espectrofotometría de microvolúmenes y observación en gel de agarosa. Se amplificaron los fragmentos 16s y rpoB mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y se obtuvo secuencias de ADN por medio del método Sanger y secuenciación de alto rendimiento, ensambladas con herramientas bioinformáticas y comparadas con las existentes en el banco genético empleando la plataforma Blast® para identificar la taxonomía. Se evaluó el porcentaje de degradación de mercurio y cianuro a tres concentraciones mediante el método de dilución en caldo, determinando la concentración final de cada contaminante después de 5 días por métodos estandarizados y la densidad óptica celular alcanzada por las cepas empleando la absorbancia en la escala de McFarland. Se logró caracterizar 8 cepas bacterianas dentro de los géneros *Pseudomonas sp*, *Bacillus sp*, *Staphylococcus sp*, *Micrococcus sp*, e *Hydrogenophaga sp* con más del 99,32% de similitud; mismas que alcanzaron un porcentaje de degradación de cianuro entre 7,94% y 66,24% y entre 96,31% y 98,80% en el medio con mercurio, concluyendo así que se pueden emplear para la remoción de contaminantes provenientes de procesos mineros. Se recomienda estudiar la interacción biológica entre especies y la concentración máxima de contaminantes a la que exista crecimiento microbiano para ser empleadas en procesos de biorremediación.

Palabras clave: <RELAVE MINERO>, <BACTERIA>, <AISLAMIENTO>, <CARACTERIZACIÓN MOLECULAR>, <DENSIDAD ÓPTICA CELULAR>, <CIANURO>, <MERCURIO>, <BIORREMEDIACIÓN>.

0454-DBRA-UPT-2023



ABSTRACT

The objective of this study was the isolation, characterization and molecular identification of bacterial strains from mining tailings in the San Carlos de las Minas - Zamora Chinchipe sector to evaluate the possible biodegrading potential against mercury concentrations (Hg) and cyanide (CN). The bacterial strains were isolated in nutrient agar by striate seeding; cell morphology was studied based on macroscopic, differential staining and motility tests. Molecular characterization was done by extracting DNA using conventional methods, quality analysis by microvolume spectrophotometry and observation in agarose gel. The 16s and rpoB fragments were amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR). DNA sequences were obtained using the Sanger method and high-performance sequencing, assembled with bioinformatics tools and compared with those existing in the gene bank using the platform. Blast® to identify taxonomy. The percentage of mercury and cyanide degradation at three concentrations was evaluated using the broth dilution method, determining the final concentration of each contaminant after five days by standardized methods and the cellular optical density reached by the strains using the absorbance on the scale. From McFarland. It was possible to characterize eight bacterial strains within the genera *Pseudomonas* sp, *Bacillus* sp, *Staphylococcus* sp, *Micrococcus* sp, and *Hydrogenophaga* sp with more than 99.32% similarity; same that reached a percentage of cyanide degradation between 7.94% and 66.24% and between 96.31% and 98.80% in the medium with mercury, thus concluding that they can be used for the removal of contaminants from processes miners. It is recommended to study the biological interaction between species and the maximum concentration of contaminants at which microbial growth can be used in bioremediation processes.

Keywords: <MINING TAILINGS, <BACTERIA>, <ISOLATION>, <MOLECULAR CHARACTERIZATION>, <CELLULAR OPTICAL DENSITY>, <CYANIDE>, <MERCURY>, <BIOREMEDIATION>.

0454-DBRA-UPT-2023



Ing. Paul Obregón. Mgs.

0601927122

INTRODUCCIÓN

La minería metálica es una de las actividades económicas más relevantes en el país, se ha caracterizado por el incesante conflicto socioambiental que frena su desarrollo, pues desde hace ya algunos años el gobierno ecuatoriano apostó a la explotación minera a gran escala con dos proyectos masivos, Fruta de Norte y el Mirador, quienes han inyectado a la económica ecuatoriana, desde 2003 hasta mayo de 2021 para Fruta del Norte y desde 2010 hasta mayo de 2021 para El Mirador, un total de USD 454,42 millones por pago de impuestos. Conjuntamente estos proyectos han generado alrededor de 22 808 empleos entre directos e indirectos, únicamente en la provincia de Zamora Chinchipe. (Banco Central del Ecuador 2021, pp. 7-14)

A pesar del notorio beneficio que otorga la minería metálica al país, se generan grandes controversias por la explotación a gran escala de estos recursos, pues se cuestiona si esta masificación industrial justifica los daños causados al ecosistema y comunidades cercanas, donde el principal medio afectado son los recursos hídricos, así como el despojo de territorios a las comunidades indígenas. Es así como grandes movimientos sociales y ecologistas, encabezados por grupos indígenas políticamente activos, exponen su postura en contra del avance de estos proyectos, sustentándose en políticas ambientales, instauradas por el mismo gobierno que impulsa la actividad minera, donde se priman los derechos de la naturaleza. (Vázquez, Leifsen y Delgado 2017, p. 172).

Actualmente, las instituciones impulsan los proyectos mineros sustentables o ambientalmente responsables las cuales se fundamentan en políticas neo-extractivistas (Vázquez, Leifsen y Delgado 2017, p. 171), mismas que a su vez son cimentadas sobre modelos del imperialismo ecologista y la injusticia ambiental provocada por los impactos de la explotación (Clark y Bellamy 2012, p. 7); sin embargo, los procesos de extracción son muy contaminantes y aún palpables, pues la generación de toneladas de residuos depositados en los relaves mineros los ha llevado a convertirse en pasivos ambientales por la acumulación de compuestos químicos, principalmente metales pesados y explosivos; estos focos de contaminación no han recibido ninguno tipo de atención para su remediación luego del cese de actividades, provocando que el grado de afección sea aún más evidente. El problema aumenta por la aparición de la minería ilegal, ya que estas actividades al no ser reguladas por ningún organismo gubernamental no tienen a quien responder por una responsabilidad ambiental, provocando que la riqueza de pocos se convierta en el perjuicio de muchos por los efectos derivados de su explotación, pues aquí no existen sitios físicos para el depósito y control de sedimentos, sino que estos residuos son vertidos directamente en los cuerpos de agua o cercano a ellos. (Carrasco y León 2018, pp. 87-90)

JUSTIFICACIÓN

Zamora Chinchipe es considerada como la capital minera del país, pues el 54% de aportes tributarios mineros provienen de esta provincia, cuya totalidad del territorio se halla concesionado a las empresas mineras (Enriquez 2010, p. 19) y es aquí donde se instauran los dos proyectos mineros a gran escala más importantes del Ecuador. Estos y otros sectores mineros a mediana y pequeña escala y juntamente con la minería ilegal han volcado en controversias su desarrollo, ya que el grado de afección ambiental es enorme comparado con el beneficio neto aportado. La alta acumulación de residuos en relaves mineros cargados con contaminantes como cianuro, mercurio y otros metales pesados, así como también concentraciones trazas de explosivos; son uno de los focos ambientales políticamente olvidados ya que con el cese de actividades, principalmente en la minería de río o artesanal, los vestigios explotados son abandonados sin el cumplimiento de ninguna medida ni reparación ambiental, provocando que esta contaminación puntual se esparza hacia otros lugares por acción de lluvias o arrastre por las corrientes del río.

A pesar de ello, estos sitios representan un alto nivel de interés científico ya que en estos relaves mineros se producen de forma natural consorcios microbianos autóctonos característicamente tolerantes a los contaminantes presentes en el sedimento. Rodríguez & Paredes (2019) reportaron la presencia de 5 cepas diferentes aisladas de un relave minero en Cerro Colorado – Perú, pertenecientes a los géneros *Serratia*, *Erwinia*, *Rhodococcus*, *Agrobacterium* y *Acinetobacter*, mismos que fueron sometidos a pruebas para comprobar su potencial degradador y productor de energía eléctrica (Rodríguez y Paredes 2019, pp. 62-64). Por otro lado, Cornejo (2016) también registra la presencia de géneros como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Brevundimonas*, *Alkalibacterium*, *Staphylococcus*, *Leucobacter*, entre otros, tanto en muestras de suelos como de agua contaminadas por cianuro, extraídas de un relave minero de la región La Libertad – Perú (Cornejo 2016, pp. 40-45).

A nivel nacional existen pocos estudios donde se han identificado cepas microbianas aisladas de relaves mineros, como el estudio de Duque, et al. (2016) ejecutado con muestras extraídas del cantón Ponce Enríquez de la provincia del Azuay, donde lograron caracterizar 8 cepas bacterianas identificadas como bacilos gran negativos de los géneros *Pseudomona*, *Vibrio* y *Pasteurella* (Duque, et al., 2016, pp. 14-19). De la misma forma Unda (2020) logró identificar 15 cepas biodegradadoras de cianuro donde destacan los géneros *Bacillus* y *Burkholderia*; así también 17 cepas biodegradadoras de arsénico destacando los géneros *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomona* y *Enterobacter* (Unda, 2020, pp. 40-41).

Con lo antes mencionado, se comprende la importancia de los relaves mineros para el sector científico; sin embargo, la cantidad de información existente en el país es reducida, sobre todo aquellas evaluaciones que hayan probado la utilización de microorganismos para la biodegradabilidad de mercurio; por ende se plantea levantar información de importancia biotecnológica para determinar la posible capacidad de biorremediación de estos consorcios microbianos frente a concentraciones de mercurio y cianuro, partiendo de una caracterización filogenética y tomando como fundamentos los estudios científicos donde se reporta la utilización de bacterias para procesos de biodegradación; dejando abierta la posibilidad para utilizar estos consorcios microbianos como base para el diseño y ejecución de nuevos tratamientos de biorremediación *in-situ*, como posible solución a los impactos ambientales significativos generados por esta actividad económica de vital sustento para comunidades amazónicas.

OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo general

- Aislar, caracterizar e identificar bacterias provenientes de relaves mineros del sector San Carlos de las Minas – Zamora Chinchipe.

Objetivos específicos

- Determinar las características físicas, químicas y microbiológicas de los sedimentos extraídos de relaves mineros.
- Aislar cepas bacterianas de los sedimentos para obtener cultivos puros.
- Identificar la filogenia de las especies bacterianas aisladas por medio de análisis moleculares.
- Evaluar en laboratorio el posible potencial degradador de las cepas bacterianas identificadas frente a concentraciones de cianuro y mercurio.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Minería metálica

Moreano et al. (2019), describe a la minería como una actividad económica que se encarga de la exploración, explotación y aprovechamiento de minerales metálicos extraídos de yacimientos subterráneos con fines comerciales. (Moreano et al. 2019, p. 2)

1.1.1. Fases de la minería metálica

El (Banco Central del Ecuador, 2016, p. 2) describe siete fases de la minería:

- Prospección; es la búsqueda de nuevas áreas o yacimientos posiblemente mineralizadas.
- Exploración; se refiere a la caracterización del yacimiento, desde su tamaño, forma, contenido y calidad del mineral existente. Se incluye también una evaluación económica donde se contemplan actividades como: mapeo geológico, muestreo geoquímico de sedimentos a lo largo de drenajes, muestreo sistemático del suelo y líneas de geofísica y muestreo de afloramientos y sondajes.
- Explotación; comprende todas las actividades destinadas a la preparación y desarrollo del yacimiento, así como también aquellas que permitan la extracción y transporte del mineral.
- Beneficio; son los diferentes tratamientos que se le da a los minerales explotados para aumentar su contenido útil o ley.
- Fundición; son aquellos procesos técnicos destinados a separar los metales de interés de los minerales obtenidos en el beneficio.
- Refinación; se refiere a la purificación para convertir los productos metálicos en metales de alta pureza.
- Comercialización; es la actividad de compraventa, negociación o intercambio de los productos originarios de la actividad minera.

1.2. Minería en Ecuador

La minería en el país ha sido una de las actividades económicas más importantes desde hace ya muchos años, sin embargo, en la última década ha podido desarrollarse de una forma permanente apoyada por el estado, haciendo que se promueva la minería a gran escala. Según el ministro

Córdova hasta el 2017 la actividad minera representaba el 1% del PIB haciendo una estimación que para 2020 este porcentaje alcance el 4% con la ayuda de los proyectos a gran escala, Fruta del Norte, Mirador y San Carlos Panantza (Larenas, Fierro y Fierro, 2017, p.71); sin embargo el Banco Central del Ecuador reporta que este porcentaje únicamente llega a 0,49% en este mismo año, manteniendo constante hasta el 2021 (Banco Central del Ecuador 2021, p. 27).

En el territorio ecuatoriano existe una superficie total concesionada a minas y proyectos mineros de 104 909 hectáreas distribuidas en siete provincias, donde Morona Santiago ocupa el mayor porcentaje con 38 548 hectáreas. A pesar de ser esta la de mayor extensión territorial, fue la provincia de Zamora Chinchipe la que recibió una mayor inversión durante enero y mayo de 2021, con un total de USD 48,3 millones, lo que representa el 69,2% de la inversión total en minas y proyectos mineros. (Banco Central del Ecuador 2021, p. 5)

Por otro lado, la actividad minera ha representado un impacto social importante hasta el primer trimestre del 2021, pues se ha logrado generar un total de 27 876 empleos de los cuales 6 969 corresponden a empleos directos y 20 907 a indirectos. Cabe recalcar que de este total 22 808 corresponden exclusivamente aquellos generados en Zamora Chinchipe. (Banco Central del Ecuador 2021, p. 6)

Dentro de los principales minerales metálicos explotados en el Ecuador se destacan el oro, plata, cobre y sus concentrados; donde para el 2015 las exportaciones auríferas se catalogaron como el cuarto producto de exportación no petrolera más relevantes para la economía del país (Banco Central del Ecuador, 2016, p. 2).

1.3. Efectos ambientales de la actividad minera

Juntamente con la búsqueda de crecimiento para la minería, han existido factores que no lo permiten, uno de estos son los conflictos ambientales que en la actualidad son defendidos por varios grupos sociales directa o indirectamente afectados.

Dentro de los principales efectos ambientales causados por la minería se encuentra la contaminación temporal o permanente de los recursos hídricos subterráneos o superficiales, que, por acción de reactivos químicos usados en los procedimientos de extracción del mineral, como por ejemplo el cianuro empleado en piscinas de lixiviación o mercurio para amalgamar el oro; son desechados junto a los residuos sólidos de roca y dispuestos en sitios estratégicos denominados depósitos de relaves mineros; sin embargo si esta disposición final no es controlada se pueden producir arrastres pluviales o por escorrentía afectando a otros sistemas biológicos,

recalcando que en la minería artesanal o ilegal estos son directamente desechados a los cuerpos de agua.(Oviedo et al. 2017, p. 438). La acumulación excesiva y prolongada de estos relaves genera reacciones químicas entre los residuos de rocas sulfurosas y el agua disponible, derivando en drenajes ácidos (pH menores a 3) que por lixiviación pueden llegar a cuerpos de agua subterráneos o fluir con el agua superficial (Environmental Law Institute 2000, p. 8).

Por otro lado, la expansión territorial que se da como fruto de la búsqueda de nuevos yacimientos o la continua extracción de la actividad, ha provocado la pérdida de la capa vegetativa y destrucción de suelos; así como también erosión del suelo, despojo territorial de la vida silvestre y pérdida del hábitat de especies nativas (Peña y Menéndez, 2016, p. 238).

Lillo (2012) menciona que la minería también contribuye a la contaminación atmosférica debido a las emisiones de material particulado causadas por las actividades extractivas o durante procesos de carga y transporte del material. Por otro lado, existe una emisión de gases originados por la maquinaria, así como también gases naturales encerrados en el material rocoso que se libera por las excavaciones. La formación de aerosoles tóxicos durante los procesos de explotación son también contaminantes emitidos a la atmosfera, principalmente cuando se emplean procedimientos hidrometalúrgicos donde se riega pilas con el mineral a extraer con químicos de alta toxicidad por medio de aspersión, por ejemplo, compuestos sulfúricos para minería de cobre o cianuro de sodio para minería aurífera (Lillo, 2012, pp. 3-9).

1.4. Consorcios bacterianos en relaves mineros

Los relaves mineros depositados a cielo abierto representan un nuevo ecosistema para la generación de microorganismos de forma natural. Muchos de estos organismos desarrollan capacidades para sobrevivir en estos ambientes, los cuales se hallan cargados con productos químicos contaminantes. Generalmente utilizan los compuestos químicos como nutrientes en su metabolismo, lo que deriva en una eliminación, inmovilización o neutralización de contaminantes (Dinis et al. 2020, p. 10103).

Con el desarrollo tecnológico, los métodos para aislar e identificar estos organismos han sido más sencillos y fáciles de aplicar, por lo que se ha logrado caracterizar diversas especies en sectores mineros específicos con capacidades particulares. Varios autores han podido aislar diversos microorganismos con su respectiva caracterización para identificar los géneros y especies.

Rodríguez & Paredes (2019) reportaron la presencia de 5 cepas diferentes aisladas de un relave minero en Cerro Colorado – Perú, pertenecientes a los géneros *Serratia*, *Erwinia*, *Rhodococcus*, *Agrobacterium* y *Acinetobacter*, mismos que fueron sometidos a pruebas para comprobar su potencial degradador y productor de energía eléctrica (Rodríguez & Paredes, 2019, pp. 62-64). Por otro lado, Cornejo (2016) registra la presencia de géneros como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Brevundimonas*, *Alkalibacterium*, *Staphylococcus*, *Leucobacter*, entre otros, tanto en muestras de suelos como de agua contaminadas por cianuro, extraídas de un relave minero de la región La Libertad – Perú (Cornejo, 2016, pp. 40-45).

Algunos estudios se han desarrollado en territorio ecuatoriano, dentro de ellos se encuentra el estudio de Duque, et al. (2016) ejecutado con muestras extraídas del cantón Ponce Enríquez de la provincia del Azuay, donde lograron caracterizar 8 cepas bacterianas identificadas como bacilos gran negativos de los géneros *Pseudomona*, *Vibrio* y *Pasteurella* (Duque et al., 2016, pp. 14-19). De la misma forma Unda (2020) logró identificar mediante el sistema Microgen™ GN-ID, 15 cepas biodegradadoras de cianuro donde destacan los géneros *Bacillus* y *Burkholderia*; así también 17 cepas biodegradadoras de arsénico destacando los géneros *Bacillus*, *Burkholderia*, *Pseudomona* y *Enterobacter* (Unda, 2020, pp. 40-41).

1.5. Métodos de aislamiento de microorganismos

Para poder obtener cultivos puros, es decir, muestras que contengan una única especie de microorganismos, es necesario aplicar un protocolo específico de acuerdo con el requerimiento del estudio. Cabe mencionar que el aislamiento se puede realizar directamente de la muestra inicial cuando se ha comprobado que el número de microorganismos es suficiente y cuando se hayan en baja proporción será necesario llevar a cabo un procedimiento previo al aislamiento, denominado enriquecimiento. Generalmente este último se realiza en medios de cultivo en estado líquido bajo condiciones controladas. (Lim, 2020, p. 5)

Dentro de los procedimientos más conocidos para el aislamiento de microorganismos se tienen:

1.5.1. Métodos Generales

1.5.1.1. Estriado en placa

Comprende el método más utilizado para el aislamiento de microorganismos aerobios estrictos o facultativos. Una vez se tiene preparado el medio de cultivo en la caja Petri y la solución

heterogénea de microorganismos, con un asa de cultivo se toma una muestra de la población mixta y se frota sobre la superficie del medio de cultivo en forma de zig-zag formando las estrías. Luego de ello, se flamea el asa sobre un mechero para eliminar los organismos aun adheridos. Se toca la región de las ultimas estrías formadas y se repite el proceso sobre la superficie del medio de cultivo sin sembrar. Este protocolo permite separar y sembrar células individuales. Ya finalizado el estriado, se lleva a incubar las cajas Petri bajo condiciones adecuadas para favorecer que las células experimenten un número de divisiones que sea visible, recalcando que cada célula en cada colonia serán copias exactas de aquella que ha sido aislada inicialmente (Tovar, 2012, p. 1).

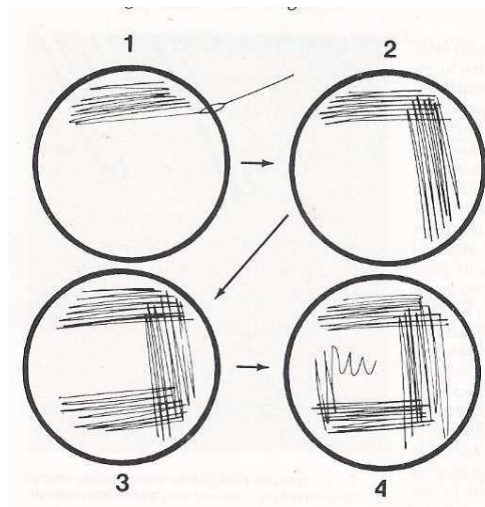


Ilustración 1-1: Aislamiento por estriado en placa

Fuente: (Alain, 2012, p.1)

1.5.1.2. *Vertido en placa*

Para este proceso es necesario que la mezcla heterogénea de microorganismos se halle en solución, procurando que el número de organismos por mililitro de solución. Cuando este valor es muy alto, es necesario realizar diluciones para reducir el número de microorganismos. Para ello se recurre a preparar diluciones de 10 en 10 o cuando es sumamente alta la concentración de microorganismos se puede llegar a realizar diluciones de 100 en 100.

Para esta preparación se toma 1ml de la solución microbiana y 9ml de medio estéril o solución salina. Se repetirá tantas veces como sea necesario hasta reducir el número de organismos. (Sosa et al. 2014, p. 964)

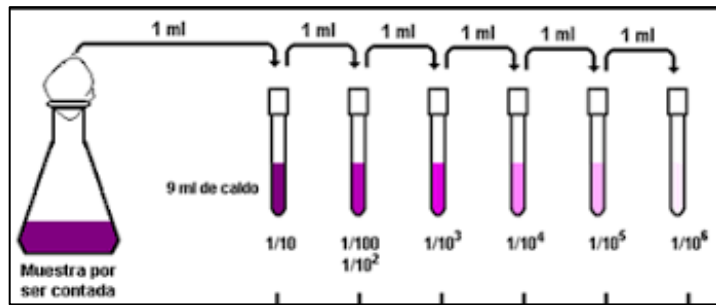


Ilustración 2-1: Preparación de diluciones seriadas
Fuente: (Sosa et al. 2014, pp. 965)

El proceso de vertido en placa se realiza con el medio de cultivo fundido y la dilución preparada. Ambos se vierten en la placa Petri al mismo tiempo, por lo que algunas células quedaran embebidas en el agar y otras crecerán en la superficie, mencionado que estas últimas alcanzarán un mayor desarrollo en tamaño de colonias (Tovar, 2012, p. 1).

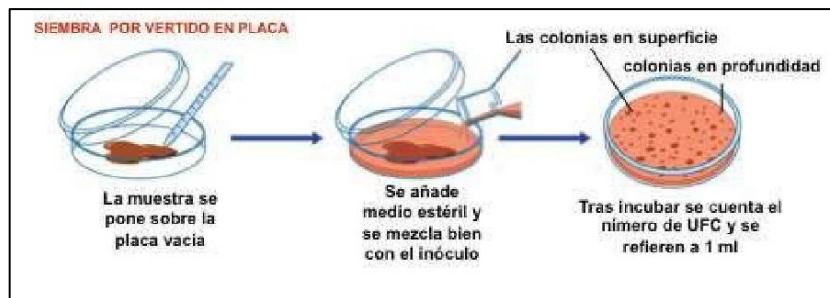


Ilustración 3-1: Aislamiento por vertido en placa

Fuente: (Scragg, 2018, pp. 42)

1.5.1.3. Extensión en superficie

Para este método también se utilizará las diluciones en caso de que el número de microorganismos sea elevado. Aquí se requiere que el medio de cultivo se halle ya en estado sólido. Con la ayuda de una pipeta se vierte un volumen pequeño del inóculo y con un asa de Digralsky de cristal estéril se extiende por toda la superficie del medio de cultivo. (Tovar, 2012, pp. 1)



Ilustración 4-1: Aislamiento por extensión en placa

Fuente: (Scragg, 2018, pp. 42)

1.5.2. Métodos Especiales

Se basan en métodos que propician un ambiente idóneo de acuerdo con las características adaptativas del microorganismo. Obsérvese que pueden existir microorganismos que posean idénticos comportamientos frente a un mismo agente físico o químico. (Lim, 2020, p. 7)

1.5.2.1. Calentamiento

Se utiliza para el aislamiento de organismos esporulados, la cual consiste en calentar la suspensión a 100°C durante 10 minutos y a 85°C durante 15-30 minutos. Luego de ello se siembra en medios sólidos (Lim, 2020, p. 7).

1.5.2.2. Agregado de álcali o ácido

Se trata la muestra con alguno de estos agentes ya que se puede encontrar organismos resistentes o no (Lim, 2020, p. 7).

1.5.2.3. Variación de la temperatura de incubación

Las muestras ya sembradas sobre los medios de cultivo se someten a variaciones de temperatura en el proceso de incubación (Lim, 2020, p. 7).

1.5.2.4. Cambios de pH

Existen también microorganismos capaces de desarrollarse en medios ácidos o básicos, por lo que su presencia en el medio de cultivo deberá ser vital (Lim, 2020, p. 7).

1.5.2.5. Presencia de sales o colorantes

Debido a la capacidad de diversos microorganismos para crecer en medios con sales, sustratos, colorantes o antibióticos, se utiliza distintos medios de cultivo con el fin de lograr su aislamiento aportándoles un ambiente óptimo (Lim, 2020, p. 7).

1.6. Caracterización molecular de microorganismos

Previo al desarrollo de técnicas moleculares para la identificación de microorganismos, estos eran identificados basándose en sus características morfológicas y fisiológicas. El biotipado, tipado de fagos, el seriotipado, los patrones de susceptibilidad antimicrobiana, el tipado de bacteriocinas y otras técnicas basadas en proteínas, son algunos ejemplos de los métodos fenotípicos empleados. Estos métodos presentaban varios problemas relacionados con la imposibilidad de reproducirlos, discernirlos o tipificarlos; además de que caracterizan a los microorganismos basándose en los resultados de la expresión génica, por lo que son susceptibles a variaciones por condiciones ambientales, como temperatura, fase de crecimiento y mutación espontánea (Fakruddin et al. 2013, p. 397).

Debido a estas deficiencias, se desarrollaron métodos genotípicos, es decir, basados en las características genéticas de los organismos. Todos estos métodos se caracterizan por la apreciación de bandas de ADN ya sean por restricción, amplificación por PCR, hibridación o digestión. Algunas de las técnicas de patrones de bandas de ADN se sustentan en la presencia/ausencia de sitios de restricción polimórficos, mientras que otras se basan en las homologías con cebadores de oligonucleótidos cortos. A continuación, se describen algunos de los métodos más utilizados. (Fakruddin et al. 2013, p. 397).

1.6.1. Métodos basados en la restricción del ADN

1.6.1.1. Análisis con endonucleasas de restricción de ADN plasmídico (REAP)

Esta técnica se emplea para aquellas bacterias que poseen plásmidos, los cuales se pueden identificar de forma sencilla mediante una lisis alcalina, seguido por la electroforesis en gel de agarosa. El tamaño y número de plásmidos en la cepa son la base para su identificación. Algunas especies de bacterias albergan un único plásmido, pero de tamaño mayor, del orden de 100-150kb. Debido al gran tamaño de los plásmidos y la dificultad para diferenciarlos en ese rango, se añade un proceso de digestión con endonucleasas. Principalmente se emplea para cultivos de estafilococos y algunas especies de *Enterobacteriaceae* (Fakruddin et al. 2013, p. 398).

1.6.1.2. Análisis cromosómico con endonucleasas de restricción (REAC)

El REAC comprende el aislamiento del ADN cromosómico, la digestión con una o varias enzimas de restricción y la posterior observación de patrones de bandas discernibles (huellas dactilares) tras la electroforesis en gel de agarosa. Se generan miles de fragmentos de entre 0,5kb y 5kb de

longitud. Las bandas se tiñen directamente o se desnaturalizan dentro del gel, se secan sobre una membrana de nitrocelulosa o nylon y luego se tiñen. El patrón de bandas que se produce es característico de cada cepa y se denomina como “huella dactilar”. La diferenciación entre cepas se dará de acuerdo con sus huellas dactilares; por lo que, si el aislado muestra una banda de diferencia se consideran subtipos entre sí. Si existen dos o más bandas de diferencia se identifican como cepas diferentes. Este método tiene en cuenta variaciones menores en el material genético, como las deleciones, transformaciones, recombinación específica o mutaciones puntuales; y es por estos cambios que se crea las diferentes huellas dactilares en cada cepa, volviendo a este método tan sensible que puede rastrear un evento único causante de un cambio en el ADN (Fakruddin et al. 2013, p. 398).

1.6.1.3. Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

El RFLP comprende la digestión del ADN cromosómico por enzimas de restricción seguido por la técnica Southern Blot para la detección de loci genéticos específicos. Luego de la digestión por restricción, los fragmentos se separan en gel de agarosa y se transfieren a una membrana de nitrocelulosa o nylon. Los fragmentos inmovilizados en la membrana se hibridan con una o más sondas marcadas, las cuales solo detectan los fragmentos que tienen especificidad con ellas (Fakruddin et al. 2013, p. 398).

1.6.2. Métodos basados en la amplificación de ácidos nucleicos

1.6.2.1. Rep – PCR

La rep – PCR se basa en la amplificación de elementos de ADN repetitivos presentes en el genoma bacteriano. Los tres tipos de secuencias repetitivas más empleadas son las secuencias palindrómicas repetitivas extragénicas (elementos REP), la secuencia consenso intergénica repetitiva enterobacteriana (ERIC) y los elementos BOX. Todos estos elementos son genéticamente estables y difieren entre sí por el número y localización cromosómica en cada especie, por lo que permite una diferenciación bacteriana a nivel de especie, subespecie y cepa. Los elementos REP poseen de 33 a 40pb que constan de un tallo palindrómico conservado, un bucle variable de 5pb y 6 posiciones degeneradas. Por otro lado, los elementos ERIC poseen de 124 a 127pb con una repetición invertida central conservada, localizada en regiones extragénicas de varias enterobacterias. Estos dos tipos de elementos son modelos característicos de bacterias gramnegativas y su equivalente para especies grampositivas son los elementos BOX que son secuencias intergénicas de 154pb presente en varias posiciones génicas (Fakruddin et al. 2013, pp. 399-400).

1.6.2.2. PCR – RFLP

La PCR (Polimerase Chain Reaction) es una técnica importante en biología molecular para la amplificación de secuencias cortas de ADN basada en la reacción natural de polimerasas para crear millones de copias de un fragmento específico. La PCR – RFLP implica el uso de cebadores específicos para amplificar loci genéticos específicos. Una variación a esta técnica es la PCR – Ribotipado, en donde el locus específico utilizado para la amplificación es la región espaciadora intergénica del ADN ribosómico. Así también, una variación de esta última es el ARDRA en donde se amplifica la región del gen ARNr 16S del operón *rrn* y se digiere con una endonucleasa de restricción (Fakruddin et al. 2013, p. 399).

1.6.2.3. Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE)

La PFGE considera la extracción de ADN cromosómico de células bacterianas retenidas en tapones de agarosa, donde las bacterias sufren una lisis para liberar el material génico y se someten a digestión por endonucleasas de restricción de corte raro, como XbaI, NotI, SpeI, etc, cuyos sitios de reconocimiento son poco comunes. Posteriormente se realiza la electroforesis en gel de agarosa cambiando periódicamente la dirección y duración del campo eléctrico. Los pulsos cortos separan los fragmentos pequeños y los pulsos más largos separan las moléculas más grandes. Finalmente se tiñe con bromuro de etidio y se lee el patrón electroforético. Esta técnica permite la separación de fragmentos de entre 10 a 800 kb. (Fakruddin et al. 2013, p. 400).

1.6.2.4. Polimorfismo de longitud de fragmento amplificado (AFLP)

Para la técnica AFLP se requiere de una pequeña fracción de ADN genómico purificado para ser digerido con dos enzimas de restricción diferentes, una muy frecuente como *EcoRI* o *HindIII* y otra poco frecuente como *MseI* o *TaqI*. Luego de ello, los fragmentos de restricción se ligan a adaptadores que poseen una secuencia de acuerdo con el sitio de identificación de la enzima de restricción y una mutación específica, de forma tal que el sitio de restricción no se restaure tras la ligación. Posteriormente los fragmentos ligados se llevan a amplificación por PCR en condiciones estrictas con dos cebadores, cada uno complementario con una u otra molécula adaptadora. Adicional a esto, el extremo 3' de cada cebador se prolonga entre 1 o 3 nucleótidos más allá del sitio de restricción, por lo que se obtiene una amplificación selectiva de fragmentos únicos que poseen nucleótidos complementarios al nucleótido 3' selectivo del cebador. (Fakruddin et al. 2013, pp. 400-401).

1.6.2.5. ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)

Esta técnica se fundamenta en la amplificación arbitraria de secuencias polimórficas de ADN, llevada a cabo por uno o más cebadores cuyas secuencias son aleatorias y no están diseñadas bajo ningún concepto de especificidad. Los cebadores se van uniendo a las secuencias y forman amplicones cortos bajo condiciones de baja rigurosidad. Continuamente estas condiciones se van volviendo más estrictas para que los cebadores formen secuencias de longitudes fijas. Esta técnica explora toda la secuencia genómica ya que los cebadores no están dirigidos a ningún locus genético específico, por lo que se pueden producir varios ciclos para obtener fragmentos diferentes, variando las condiciones experimentales (Fakruddin et al. 2013, p. 399).

1.6.2.6. Dactiloscopia por amplificación directa (DAF)

Este método también emplea cebadores arbitrarios, sin embargo, son más cortos (entre 5-8 bases de longitud). Generalmente este procedimiento no se usa con frecuencia ya que genera huellas dactilares complicadas que solo podrían leerse por tinción con plata, más no mediante tinción con bromuro de etidio/fluorescencia. Adicionalmente, la electroforesis requiere exclusivamente gel de poliacrilamida en lugar de gel de agarosa (Fakruddin et al. 2013, p. 399).

1.6.3. Métodos basados en la secuenciación de ADN

1.6.3.1. Tipificación de secuencias multilocus (MLST)

El método MLST se fundamenta en la secuenciación de aproximadamente 500 nucleótidos de una serie de genes de mantenimiento, es decir, aquellos que se expresan en todas las células, pero a niveles no significativos. La secuenciación de estos fragmentos se considera como alelos únicos y los dendrogramas se crean a partir de la diferenciación entre pares en los perfiles alélicos multilocus mediante análisis de clusters. La técnica MLST es idónea para estudiar casos epidemiológicos a largo plazo y a nivel global; así también la evolución de los microorganismos y para la construcción de bases de datos mundiales evaluables y comparables. Se considera como una de las técnicas más fiable y reproducible frente a las antes mencionadas; sin embargo, es muy costosa y diligente de realizar. (Fakruddin et al. 2013, p. 401).

1.6.3.2. Método SANGER

El método SANGER, o también llamado secuenciación por terminación de cadena o secuenciación dideoxi, es una técnica ampliamente utilizada que se basa en la polimerización del ADN empleando dideoxinucleóticos (ddNTPs) como marcadores para terminar la reacción. Estos ddNTPs se diferencian de los deoxinucleótidos (dNTPs) por la ausencia del grupo hidroxilo en el tercer carbón de su ribosa y por la presencia de un fluoróforo para la detección espectrofotométrica. Para el desarrollo de esta técnica se necesita la muestra de ADN a secuenciar, los primers, la Taq polimerasa, dNTPs y ddNTPs. Cuando la reacción se inicia por acción de los primers, existe un ensamblaje correcto de dNTPs por acción de la Taq polimerasa; sin embargo, cuando se incorpora un ddNTPs, se imposibilita la formación del puente fosfodiéster entre el C3'OH y el C5' del siguiente dNTPs, por lo que la reacción en ese fragmento se termina. Cuando se da por finalizada la secuenciación, los productos se llevan a electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida y se genera una clasificación de los fragmentos de acuerdo con el tamaño, siendo los más pequeños los que llegan más cerca al polo positivo ya que atraviesan la red del gel más fácilmente (Verma, et al., 2017, pp. 13-14)

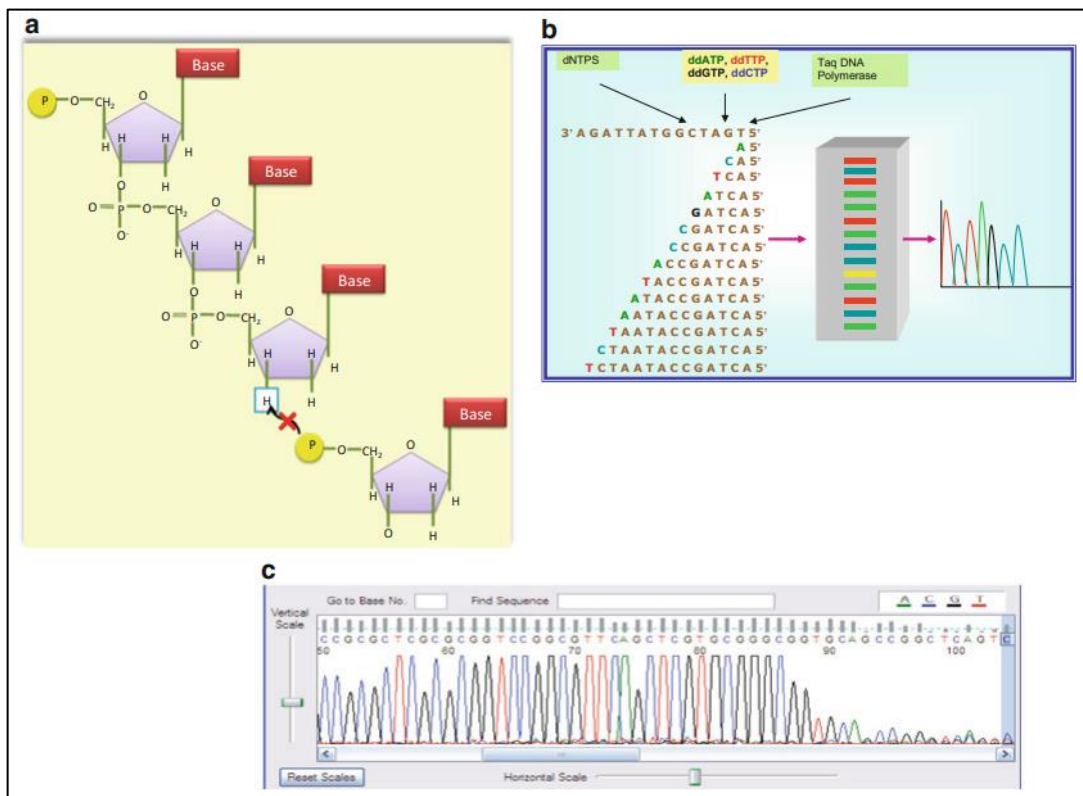


Ilustración 5-1: Método SANGER. a) Síntesis de ADN con adición de dNTPs y un ddNTP final que termina la reacción. b) Electroforesis capilar y detección de fragmentos. c) Electroferograma de la secuencia de ADN.

Fuente: (Verma, et al., 2017, pp. 13-14)

Para la lectura de los productos de secuenciación se emplea también la electroforesis capilar, la cual es una técnica automatizada donde cada fragmento desde el de menor tamaño al más extenso pasan por los capilares y se detecta mediante un haz de luz cada ddNTPs que está marcado con un fluoróforo. Estos fragmentos se van ensamblando con ayuda de softwares específicos y se genera una secuencia completa del ADN inicial, permitiendo la identificación de especies (Verma, et al., 2017, pp. 13-14).

1.7. Bioinformática en la identificación molecular de microorganismos

Kischinevzky & Rodarte (2011) definen a la bioinformática como un campo científico que integra a la biología, las ciencias computacionales y la tecnología de la información en una disciplina única. Dio paso a la creación y mantenimiento de bases de datos en la cuales se guarda información biológica tales como secuencias de nucleótidos (genes, secuencias reguladoras, etc.) y de aminoácidos (proteínas) (Kischinevzky & Rodarte, 2011, p. 33). La bioinformática usa programas informáticos que permiten realizar diversas aplicaciones, como la determinación de las funciones de genes y proteínas, establecimiento de relaciones evolutivas entre organismos o predecir la conformación tridimensional de las proteínas (Austin, 2019, p. 1).

El constante crecimiento de la información biológica que se iba descubriendo con el desarrollo de estudios del entorno, obligó al ser humano a desarrollar sistemas para el almacenamiento de esta información, así también el análisis y difusión de datos biológicos, médicos, conductuales o de salud. A toda esta rama, el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH), la denominó como bioinformática y la catalogó como la investigación, desarrollo o aplicación de herramientas computacionales para la gestión de datos de la biología moderna (Menéndez & Rivas, 2014, p. 2).

Las bases de datos biológicas actuales se crearon basadas en el modelo Atlas de Margaret Dayhoff y Richard Eck, tal es el caso de Protein Data Bank (PDB) para estructuras de moléculas biológicas y GenBank para secuencias de ADN y proteínas (Menéndez & Rivas, 2014, p. 2).

Haciendo referencia a esta última, GenBank se ha convertido en una herramienta esencial en investigación. Se caracteriza por ser una base de datos pública donde se almacena secuencias de nucleótidos, bibliografía de apoyo y anotación biológica. Esta base de datos incluye contenido de ADN, ARN mensajero (ARNm), ADN complementario (ADNc), marcadores de secuencia expresada (EST) y datos crudos de secuencias realizadas masivamente (Cañedo & Arencibia, 2004, pp. 12-14).

Conforme estas bases de datos fueron creciendo, fue necesario desarrollar nuevas interfases entre los remitentes de secuencias y los usuarios de tales bases. Debido a este factor se fueron ampliando los recursos informáticos para incluir también programas de búsqueda y comparación de secuencias de nucleótidos y aminoácidos, traducción de secuencias de nucleótidos a aminoácidos o búsqueda de señales estructurales o funcionales en las secuencias. Por ello, en 1980 se crea el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés) quien pasó a administrar la información del GenBank con ayuda de otros centros de investigación como el NIH, la Biblioteca de Datos del Laboratorio Europeo de Biología Molecular (EMBL) y el Banco de Datos de DNA en Japón (DDJJ) (Kischinevzky & Rodarte, 2011, p. 33).

1.8. Biorremediación

Thieman & Palladino (2010) describen a la biorremediación como un proceso de limpieza del medio ambiente contaminado con productos químicos utilizando organismos vivos que transformen materiales peligrosos en sustancias menos tóxicas. Se da un aprovechamiento de las reacciones y procedimientos naturales que los organismos emplean para descomponer productos y obtener energía y nutrientes. (Thieman & Palladino, 2010, pp. 208-209).

Actualmente el deterioro ambiental es cada vez más evidente pero también los son los procesos de concientización que buscan revertir estos efectos negativos, donde se han venido trabajando en proyectos de restauración ambiental que emplean organismos vivos para eliminar, reducir o inmovilizar contaminantes ambientales. Sin embargo, la puesta en marcha de estos proyectos conlleva una serie de procesos previos a dicha ejecución, dentro de estos se hallan las evaluaciones a nivel de laboratorio para determinar si un organismo es viable o no para obtener buenos resultados, tales como pruebas de degradación, pruebas de tolerancia o sensibilidad, pruebas de crecimiento microbiano, procesos de escalamiento industrial, etc. (Thieman & Palladino, 2010, pp. 209-210).

1.9. Pruebas de degradación de contaminantes

La prueba de resistencia a metales pesados y demás contaminantes más utilizada para la evaluación de crecimiento microbiano corresponde al método de dilución en agar o caldo (macrodilución y microdilución), es decir, se produce una suplementación directa del medio de cultivo con concentraciones del analito bajo estudio, estas variaciones seriadas en la concentración ayudan a determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del elemento (Malbrán, 2012, p. 2). Puicon y Hurtado (2013) evaluaron la resistencia al mercurio de 3 cepas bacterianas del género *Pseudomonas* mediante dilución en agar, donde prepararon placas con agar

nutritivo a concentraciones de mercurio de 10ppm, 20ppm, 40ppm, 60ppm y 100ppm a partir de una solución stock de 400ppm, observando crecimiento microbiano durante 24, 48 y 72 horas (Puicon & Hurtado, 2013, p.3). Cabe mencionar que la adición del suplemento se realiza empleando sus sales comerciales, por ejemplo: cloruro de mercurio (HgCl_2), acetato de plomo [$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{OO})_2$], arsenato de sodio (Na_2HAsO_4), cloruro de cadmio (CdCl_2), cromato de potasio (K_2CrO_4), cianuro de sodio (NaCN), entre otros (Paniagua et al. 2003, p. 16).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Tipo de investigación

Se utilizó tipo de investigación exploratoria ya que se busca recopilar información acerca de la capacidad bacteriana para biodegradar metales pesados (mercurio) y cianuro presentes en relaves mineros, que en el territorio ecuatoriano es bastante reducida; así también, según el nivel de profundización, se selecciona una investigación explicativa ya que se pretende describir las características metabólicas que otorgan esta capacidad y el porcentaje de degradación que pueden alcanzar, para así establecer la base de una posible alternativa como solución a problemáticas poco estudiadas como lo es el tratamiento de estos relaves mineros con materiales biológicos. Finalmente, según la temporalidad, se tiene una investigación transeccional ya que los datos obtenidos se recolectan en un único momento.

2.2. Diseño de la investigación

La investigación se dividió en cinco fases para su desarrollo: Fase I: muestreo; Fase II: análisis fisicoquímico de las muestras; Fase III: aislamiento y purificación de cepas bacterianas; Fase IV: caracterización molecular de las cepas bacterianas y la Fase V: pruebas de degradación de contaminantes; para lo cual se opta por un método de investigación cuantitativa ya que es necesario recopilar y analizar datos; y según la manipulación de variables independientes como la especie microbiana y concentración de mercurio y cianuro (Fase V), se considera un diseño experimental que permitirá establecer en términos porcentuales la respuesta de las cepas bacterianas identificadas.

2.3. Planteamiento de hipótesis

2.3.1. *Hipótesis alternativa*

Ha1: Las bacterias aisladas y caracterizadas de los relaves mineros del sector San Carlos de las Minas son capaces de degradar al menos el 70% del cianuro en pruebas a escala de laboratorio.

Ha2: Las bacterias aisladas y caracterizadas de los relaves mineros del sector San Carlos de las Minas son capaces de degradar al menos 70% del mercurio en pruebas a escala de laboratorio.

2.3.2. *Hipótesis nula*

H₀₁: Las bacterias aisladas y caracterizadas de los relaves mineros del sector San Carlos de las Minas son capaces de degradar menos del 70% del cianuro en pruebas a escala de laboratorio.

H₀₂: Las bacterias aisladas y caracterizadas de los relaves mineros del sector San Carlos de las Minas son capaces de degradar menos del 70% del mercurio en pruebas a escala de laboratorio

2.4. Etapas de la investigación

2.4.1. *Fase I: Muestreo*

2.4.1.1. *Localización del estudio*

El estudio se realiza en los relaves mineros pertenecientes a la empresa privada Mincampa Minera Campanillas S.A. ubicada a 15 km de la parroquia San Carlos de las Minas en la provincia de Zamora Chinchipe, con una altitud entre 1705 -1720 m.s.n.m.

Tabla 1-2: Localización del área de estudio

PROYECTO FRUTA DEL NORTE			
PROVINCIA	Zamora Chinchipe		
CANTÓN	Zamora		
PARROQUIA	San Carlos de las Minas		
COORDENADAS	Punto	Latitud	Longitud
	A	4°3'28,55''S	78°47'15,55''O
	B	4°3'27,89''S	78°47'14,94''O
	C	4°3'27,32''S	78°47'14,28''O
	D	4°3'26,88''S	78°47'14,51''O
	E	4°3'26,40''S	78°47'14,80''O
	F	4°3'26,98''S	78°47'15,36''O
	G	4°3'27,67''S	78°47'15,59''O

Fuente: Google Earth, 2022

Realizado por: Medina, Edinson, 2022

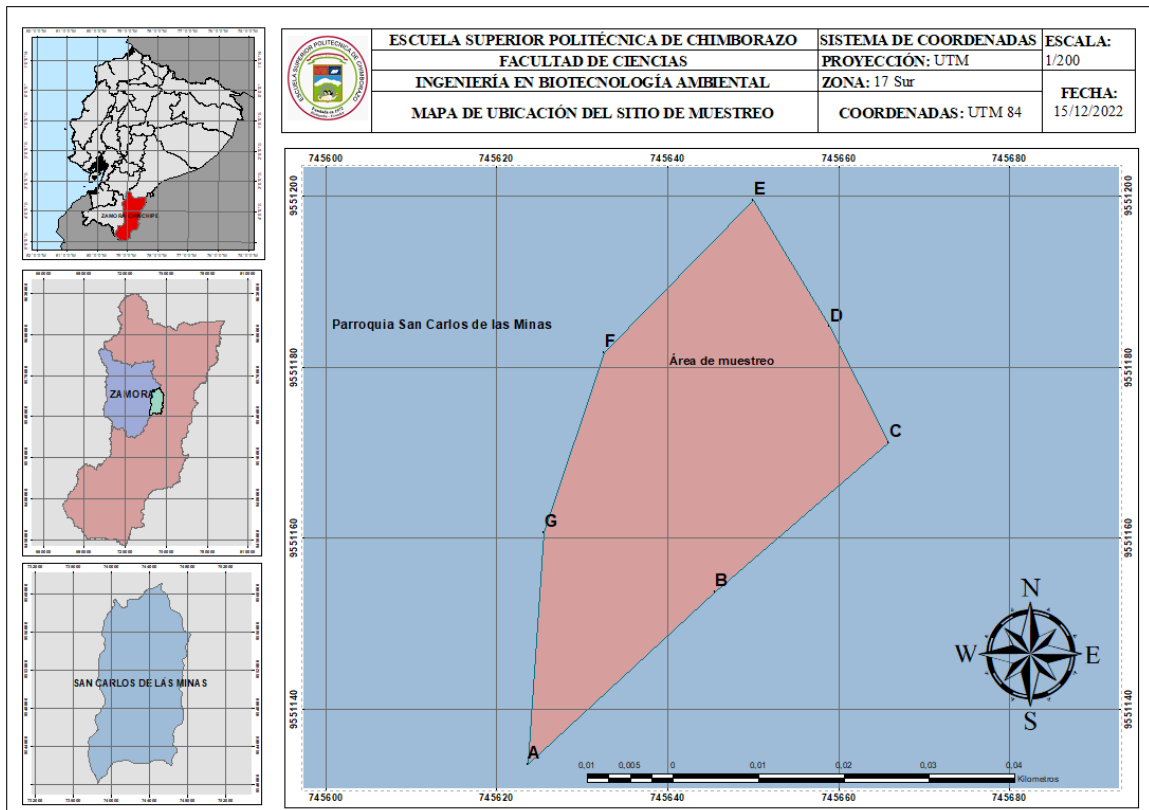


Ilustración 1-2: Mapa de ubicación de la zona de muestreo

Realizado por: Medina, Edinson, 2022

2.4.1.2. Población de estudio

Colonias bacterianas aisladas de muestras de suelo provenientes de relaveras de la empresa privada Mincampa Minera Campanillas S.A en el sector San Carlos de las Minas – Zamora Chinchipe.

2.4.1.3. Tamaño de la muestra

La muestra de suelo se recogió en el relave minero de la empresa privada Mincampa S.A ubicada en la parroquia San Carlos de las Minas, Zamora Chinchipe. El relave minero tiene una superficie de 1000m², por lo que el número de muestras se planificó de acuerdo con la siguiente ecuación.

El número de submuestras se calculó mediante la siguiente expresión:

$$n = \frac{Z^2 * p * q * N}{N * E^2 + Z^2 * p * q}$$

Donde:

$n = \text{Tamaño de la muestra}$

$N = \text{Tamaño de la población (1000m}^2\text{)}$

$Z = \text{Nivel de significancia (de 95\% es 1,96)}$

$E = \text{Error (5\%)}$

$p = \text{porcion esperada (0,05)}$

$q = 1 - p (1 - 0,05 = 0,95)$

2.4.1.4. Método de muestreo

Se diseñó un muestreo sistemático en forma de cuadrícula donde se tomó 68 submuestras, cada submuestra es de tipo puntual no perturbada y se toma por duplicado. Con la ayuda de una pala se cava formando una “V” y se extrae una porción de suelo a una profundidad de 0-10cm que deberá pesar 0,015kg aproximadamente cada una; posteriormente son homogenizadas para formar una única muestra compuesta de 1kg y su duplicado. La muestra se almacenó en bolsas plásticas de sellado hermético (ziploc) dejando una fracción de aire en la bolsa y se transportaron en un contenedor con bolsas de hidrogel congeladas a 4°C como recomienda Daglio (2005). (Daglio, Sterren y Benintende; 2005).

El protocolo de muestreo se acoge a la Guía para muestreo de suelos del Ministerio del Ambiente, bajo el marco del decreto supremo: Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para suelo. (Ministerio del Ambiente, 2014, pp. 16-18). Se considera también la normativa ASTM D 4220 (2009) “Práctica estándar para preservar y transportar muestras de suelo”. (ASTM International, 2009, pp. 4-6)

2.4.2. Fase II: Análisis fisicoquímicos de muestras

Se considera los parámetros más significativos descritos en el Anexo 1: Parámetros para valoración de la calidad inicial del suelo según su uso, componente uso de suelo minero, presente en la Norma de calidad ambiental del recurso suelo y criterios de remediación de suelos contaminados.

Cada análisis fisicoquímico se realiza por triplicado por cada muestra recolectada, es decir, se tiene un total de 6 análisis por parámetro medido, exceptuando el análisis de mercurio y cianuro que se realizó 1 repetición por muestra.

2.4.2.1. pH

El pH se determinó al mezclar 20g de muestra seca a 40°C y tamizada a <2mm con 20ml de agua destilada, removiendo durante 5 minutos y dejando reposar por al menos 15 minutos para permitir la sedimentación de sólidos. Una vez transcurrido el tiempo, se tomó lectura con un pH-metro Jenway 3510. El procedimiento sigue lo estipulado en la Normativa EPA Method 9045D, Soil and Waste pH. (EPA Method 9045D: *Soil and Waste pH*, 2004, pp. 2-3)

2.4.2.2. Conductividad eléctrica

La conductividad eléctrica específica (CE) se determinó al mezclar 20g de muestra seca a 40°C y tamizada a <2mm con 100ml de agua destilada, removiendo durante 5 minutos y dejando reposar por al menos 15 minutos para permitir la sedimentación de sólidos. Posterior a ello, se tomó lectura con el conductímetro COND 51+. El procedimiento sigue lo mencionado en la Norma ISO 11265-1994, Soil quality. Determination of the specific electrical conductivity. (EPA Method 9050A: Specific Conductance, 1996, pp. 1-2)

2.4.2.3. Humedad

Se pesó un crisol vacío y se registró su valor. En este, se pesó 20g de muestra seca a 40°C y tamizada a <2mm; se anotó también el peso con el crisol. Se llevó a la estufa a 105°C hasta obtener una masa constante y registrar su peso. La humedad se calcula mediante la expresión

$$\text{Agua (\%)}_{\text{suelo seco a } 40^{\circ}\text{C}} = \frac{a - b}{b - c} * 100$$

Donde;

$a = \text{masa en g de suelo seco a } 40^{\circ}\text{C} + \text{peso crisol}$

$b = \text{masa en g de suelo seco a } 105^{\circ}\text{C} + \text{peso crisol}$

$c = \text{masa en g del crisol}$

Este protocolo se rige bajo la norma ISO 11465: Soil quality. Determination of dry matter and water content on a mass basis – Gravimetric method. (ISO 11465: Soil quality. Determination of dry matter and water content on a mass basis – Gravimetric method, 1993, pp. 2-4).

2.4.2.4. Cianuro

Se preparó una solución de hidróxido de sodio al 50% p/v (5g de hidróxido de sodio en 10ml de agua destilada). Se pesó 25g de muestra seca a 40°C y tamizada a <2mm. En una botella ámbar

de vidrio de 1L se colocó 500 ml de agua destilada, 5ml de hidróxido de sodio 50% p/v y los 25g de muestra de suelo. Solo si existen grasas en la muestra se añaden 50ml de n-hexano. La solución se debe mantener sobre un pH de 10; si este es menor, se añade hidróxido de sodio 50% p/v en incrementos de 5ml hasta alcanzar este pH y se mantenga constante. La botella se selló y se dejó digerir por 16 h. Este proceso sigue la norma EPA 9013 A. Cyanide extraction procedure for solids and oils. (EPA Method 9013A: Cyanide extraction procedure for soil and oils, 2014, pp. 3-9).

Una vez producido el extracto antes mencionado en la botella, se tomó una alícuota de 25ml y se determinó la concentración de cianuro total mediante el Método Pyridina – Pirozolona (rango 0,002 – 0,240 mg/L CN) empleado en el Laboratorio de Calidad del Agua, de la ESPOCH, basado en un proceso colorimétrico, donde se añaden tres reactivos comerciales de la marca Hach y se deja reaccionar durante 30s, 10s y 30min, respectivamente, para su posterior lectura en el espectrofotómetro a 612 nm. Protocolo similar al descrito en la norma APHA 4500-CN⁻ E. Colorimetric Method from Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.

La concentración arrojada por el equipo se mide en unidades de mg/L, por lo que es necesario convertir a mg/kg para obtener el valor real de concentración en la muestra de suelo. Para ello se emplea la siguiente expresión, donde $[CN^-]^{mg/L}$ es la concentración de cianuro obtenido en el equipo, V es el volumen de aforo en litros y m es la masa de suelo en kilogramos empleada para la digestión.

$$[CN^-]_{mg/kg} = \frac{[CN^-]^{mg/L} * V}{m}$$

2.4.2.5. Mercurio

Se realizó una digestión ácida al suelo para obtener un filtrado que contiene el analito de interés (mercurio). La digestión se realizó añadiendo 1g de muestra, seca a 40°C y tamizada a <2mm, y 10ml ácido nítrico en un Erlenmeyer. Se mantiene calentando en un reverbero durante al menos 6h y cubierto con un vidrio reloj para evitar pérdidas por evaporación. Luego se dejó enfriar y se añadió 5ml de peróxido de hidrógeno y se dejó en el reverbero durante 2 horas más. Pasado el tiempo de reacción, la muestra digestada se filtró y se aforó con agua destilada a 50ml en balones de vidrio.

La determinación de mercurio se realizó mediante el método de espectrofotometría de absorción atómica por generación de hidruros y técnica de vapor frío empleado en el Laboratorio de Química

Instrumental de la ESPOCH; basado a su vez en la norma EPA 7471 A: Mercury in solid or semisolid waste (manual cold-vapor technique).

La concentración arrojada por el equipo se mide en unidades de mg/L, por lo que es necesario convertir a mg/kg para obtener el valor real de concentración en la muestra de suelo. Para ello se emplea la siguiente expresión, donde $[Hg]^{mg/L}$ es la concentración de mercurio obtenido en el equipo, V es el volumen de aforo en litros y m es la masa de suelo en kilogramos empleada para la digestión.

$$[Hg]_{mg/kg} = \frac{[Hg]^{mg/L} * V}{m}$$

2.4.3. Fase III: Aislamiento y purificación de cepas bacterianas

2.4.3.1. Análisis microbiológico

Para el análisis microbiológico se prepararon diluciones seriadas en base 10, para lo cual se siguió la metodología descrita por (Mau, et al., 2011, pp. 47) donde se parte con una solución madre tomando 10g de la muestra de suelo y mezclando en un Erlenmeyer con 90ml de agua destilada .

Se prepararon 9 tubos de ensayo con 9ml de agua destilada para las diluciones desde 10^{-2} hasta 10^{-10} . Cabe recalcar que tanto el Erlenmeyer con 90ml de agua destilada y los 9 tubos con 90ml de agua destilada, fueron previamente esterilizados en autoclave a 121°C , 1 atm, durante 45 minutos. De la solución madre se toma 1ml y se coloca en el primer tubo. De este último se toma 1ml de solución y se coloca en el segundo tubo y así sucesivamente hasta completar con las diluciones necesarias.

Se toma 0,1ml de la dilución 10^{-1} y se siembran en cajas Petri, previamente preparadas y esterilizadas con agar nutritivo, por vertido en superficie y se incuban a 37°C durante 48 horas. Se procede de la misma forma para las diluciones seriadas siguientes. Pasado el tiempo, se contabilizan las cepas y se seleccionan las cajas viables (número de colonias entre 30-300) para el aislamiento y purificación.

2.4.3.2. Aislamiento y purificación de cepas bacterianas

Con un asa de anillo se seleccionan las cepas bacterianas macroscópicamente diferentes entre sí, caracterizando por color, forma, elevación, textura y brillo según (Young, 2007, pp. 596-597); y se lleva a inoculación en nuevas cajas Petri con agar nutritivo previamente preparadas, mediante estriado en una fase. Se incuban a 37°C durante 48 horas. El proceso se repite tantas veces como sea necesario hasta obtener una única especie en cada caja.

2.4.4. Fase IV: Caracterización molecular de cepas bacterianas

2.4.4.1. Caracterización molecular y secuenciación

Las cajas Petri con los cultivos puros obtenidos (8 muestras) se llevaron al Laboratorio IdGEN para el análisis molecular mediante DNA barcoding. Inicialmente se extrajo el ADN empleando aproximadamente 100mg de biomasa. Se evaluó la integridad y calidad del ADN mediante espectrofotometría de microvolúmenes y visualización en gel de agarosa. El ADN obtenido se diluyó hasta una concentración de 20ng/μL para la amplificación mediante el método de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Vera, et al., 2012, pp. 198-199). Para esta última, se emplearon los primers rpoB: rpoB-F/rpoB-R (Ki, et al., 2009, pp. 55-56) para la muestra E3; y los primers universales 16s: 27F/1492R (Limingui Polo et al., 2022, pp. 389-400) para las muestras restantes.

Se empleó el método Sanger para la secuenciación del ADN con una purificación previa de los productos de PCR. Las secuencias obtenidas fueron limpiadas y ensambladas empleando los softwares SeqScape y SnapGene.

2.4.4.2. Identificación de especies

Se empleó el Software Blast by NCBI en donde se ingresa la secuencia de ADN obtenida en el análisis molecular y se compara con las existentes en la base de datos; y basados en el porcentaje de similitud con microorganismos ya estudiados se identifica la especie bacteriana a la que pertenece.

2.4.5. Fase V: Pruebas de degradación de contaminantes

Las pruebas de tolerancia se realizaron en tubos de ensayo con caldo nutritivo enriquecido con la sal comercial correspondiente al analito bajo estudio (cloruro de mercurio y cianuro de sodio), a

3 concentraciones diferentes con 3 repeticiones cada una. Cada especie identificada se incubó en los tubos por 5 días y se determinó la concentración inicial y final del analito por los métodos antes mencionados y la densidad celular alcanzada en los 5 días, empleando la escala de McFarland y la densidad óptica medida por la absorbancia de la muestra.

2.4.5.1. Degradación de Cianuro

El medio de cultivo se enriqueció con cianuro de sodio y se preparó soluciones a tres concentraciones diferentes, tomando como segunda concentración el límite permisible establecido en el Anexo 3: Criterios de remediación, de la Norma de calidad ambiental del recurso suelo y criterios de remediación de suelos contaminados (8,0 mg/kg); a partir de esta se calcula una disminución del 15% para la primera concentración (6,8 mg/kg) y un valor aumentado en 15% para la máxima concentración (9,2 mg/kg). Se considera como punto de partida el límite permisible presente en el ya mencionado Anexo 3, ya que como tal no se reporta una contaminación por cianuro; sin embargo, es necesario evaluar la tolerancia de los microorganismos a esta concentración ya que es el valor que se espera obtener si se emplean para procesos de biorremediación.

2.4.5.2. Degradación de Mercurio

El medio de cultivo se enriqueció con cloruro de mercurio y se preparó soluciones a tres concentraciones diferentes, tomando como mínima concentración la correspondiente al límite permisible establecido en el Anexo 3: Criterios de remediación, de la Norma de calidad ambiental del recurso suelo y criterios de remediación de suelos contaminados (10,0 mg/kg); la segunda concentración será la media de los valores obtenidos en el análisis fisicoquímico inicial de las muestras (87,575 mg/kg); y la máxima concentración será un valor aumentado en 15% del límite permisible del anexo mencionado (100,7 mg/kg).

CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Fase I: Muestreo

Se recolectaron 2 muestras con un peso de 1 kg y conformadas por 68 submuestras cada una; mismo que fue suficiente para todos los análisis realizados.



Ilustración 1-3: Superficie del relave minero muestreado

Realizado por: Medina, Edinson, 2022.



Ilustración 2-3: Proceso de recolección de muestras

Realizado por: Medina, Edinson, 2022.

3.2. Fase II: Análisis fisicoquímico de las muestras

3.2.1. pH

El potencial de hidrogeno se midió en las dos muestras recolectadas y se analizó realizando 3 repeticiones de cada una, obteniendo así los valores descritos en la Tabla 1-3.

Tabla 1-3 Determinación inicial de pH

PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS PARA CALIDAD INICIAL DE SUELO MINERO				
pH				
N° de Muestra	R1	R2	R3	Media
1	6,32	6,12	6,25	6,23
2	6,16	6,08	5,89	6,04
Media total en el relave minero				6,136

Realizado por: Medina, Edinson, 2022

Se obtuvo un valor promedio igual a 6,136; que dentro de la escala de pH para suelo se considera como moderadamente ácido, concordando con Wail & Brady (2017) donde se esquematiza la predominancia de suelos moderada y extremadamente ácidos en la zona andina y oriental del Ecuador (Weil & Brady, 2017, pp. 374-417). Como menciona Uchuari (2020) esta acidez se debe al drenaje ácido característico de suelos mineros ocasionado por el metamorfismo y lixiviación de minerales ricos en sulfatos, pues en su investigación menciona que en la zona de San Carlos de las Minas (lugar de muestreo) y gran parte del sector Nambija, predominan rocas de tipo skarn, andesita, stockwork, pórfido andesítico, hornfels y skarn silicificado (Uchuari, 2020, p.48); las cuales se componen por diversos minerales destacando la pirita, que es un mineral del grupo de los sulfuros muy común en formaciones geológicas. Este mineral bajo condiciones de aerobiosis, actividad microbiana y contacto permanente con el agua facilita el drenaje ácido, aumentando la acidez del relave.

3.2.2. Conductividad eléctrica (CE)

La Tabla 2-3 describe los valores obtenidos en el análisis de la conductividad eléctrica del relave minero bajo estudio, tal como se muestra a continuación.

Tabla 2-3: Determinación inicial de conductividad eléctrica

PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS PARA CALIDAD INICIAL DE SUELO MINERO				
Conductividad Eléctrica específica ($\mu\text{S}/\text{cm}$)				
N° de Muestra	R1	R2	R3	Media
1	1783,84	1776,23	1805,45	1788,51
2	2163,11	2116,49	2197,64	2159,08
Media total en el relave minero				1973,80

Realizado por: Medina, Edinson, 2022

La CE promedio del relave minero es igual a 1973,80 $\mu\text{S}/\text{cm}$; el cual nos permite comprender la alta concentración de iones disueltos en el medio. Dinis et al. (2020) mencionan que valores altos de CE corresponden a relaves muestreados a una profundidad entre 50-60cm, mientras que para profundidades de hasta 2 m reportan valores de CE $<1500 \mu\text{S}/\text{cm}$ (Dinis et al., 2020, p. 10109). El aumento en la conductividad eléctrica y la disminución en el pH son indicativos de la actividad oxidativa en el relave, causada por la mayor presencia de oxígeno a nivel superficial frente a profundidades mayores de muestreo.

3.2.3. Cianuro

El análisis de cianuro en las muestras arrojó los valores detallados en la Tabla 3-3 descrita a continuación:

Tabla 3-3: Determinación inicial de cianuro

PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS PARA CALIDAD INICIAL DE SUELO MINERO		
Concentración de cianuro (mg/L)		
N° de Muestra	a pH 6-8	a pH >12
1	0,007	0,005
2	0,007	0,004
Media total en el relave minero	0,007	0,0045

Realizado por: Medina, Edinson, 2022

La concentración de cianuro se determinó a dos pH diferentes debido a que inicialmente la muestra fue sometida a una digestión para pasar de un extracto sólido a uno líquido y se mantuvo a un pH >12 y el método de análisis es recomendable para muestras con pH neutro o cercano a la

neutralidad; por ello se redujo el pH entre 6-8 con ayuda de una solución de ácido clorhídrico al 1%, para así evitar un falso positivo en la determinación.

En la Tabla 4-3 se describen los valores obtenidos al realizar los cálculos para transformar las unidades obtenidas por el espectrofotómetro (mg/L) a la concentración neta en unidades de suelo (mg/kg) las cuales son comparables con las descritas en el Anexo 3: Criterios de remediación, de la Norma de calidad ambiental del recurso suelo y criterios de remediación de suelos contaminados.

Tabla 4-3: Cálculos obtenidos tras la transformación de unidades en la determinación de cianuro

PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS PARA CALIDAD INICIAL DE SUELO MINERO		
Concentración de cianuro (mg/kg)		
N° de Muestra	a pH 6-8	a pH >12
1	0,14	0,1
2	0,14	0,08
Media total en el relave minero	0,14	0,09

Realizado por: Medina, Edinson, 2022

Empleando la determinación a pH 6-8, se establece que el relave minero no presenta una contaminación inicial por cianuro de acuerdo con el Anexo 3: Criterios de remediación, de la Norma de calidad ambiental del recurso suelo y criterios de remediación de suelos contaminados, pues el límite permisible en este es de 8,0 mg/kg. Su baja concentración se debe a la presencia de minerales sulfurosos en las rocas metamórficas extraídas, las cuales luego de pasar por los procesos productivos se depositan en el relave y son susceptibles a cambios por factores ambientales. Como se mencionó anteriormente, las rocas trituradas contienen diversos minerales, entre ellos la pirita, la cual viene acompañada generalmente por otro mineral rico en sulfuro de hierro denominado pirrotita que son propensos a formar tiocianato.

3.2.4. Mercurio

Por otro lado, las concentraciones de mercurio, tanto en unidades directas del equipo (mg/L) como posterior a los cálculos (mg/kg), se describen en la Tabla 5-3, a continuación:

Tabla 5-3: Determinación inicial de mercurio

PARÁMETROS FÍSICOQUÍMICOS PARA CALIDAD INICIAL DE SUELO MINERO		
Concentración de mercurio		
N° de Muestra	R1 (mg/L)	R1 (mg/kg)
1	1,514	75,7
2	1,989	99,45
Media total en el relave minero	1,752	87,575

Elaborado por: Medina, Edinson, 2022

Por tanto, se tiene una concentración media de mercurio igual a 87,575 mg/kg y comparando nuevamente con el Anexo 3: Criterios de remediación, de la Norma de calidad ambiental del recurso suelo y criterios de remediación de suelos contaminados, se establece que el relave minero presenta un factor de contaminación entre 3,0 – 10,0 que corresponde a un grado de perturbación igual a 2, denominado “Perturbación severa” según la tabla 1: Indicadores de contaminación, de la norma antes citada. Es así como es necesario ejecutar procesos de remediación para llegar al límite permisible que es igual a 10,0 mg/kg.

3.3. Fase III: Aislamiento y purificación de cepas bacterianas

3.3.1. Análisis microbiológico

Tras la preparación de las diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-10} se inocularon en cajas Petri con agar nutritivo, mismas que después del tiempo establecido de incubación se seleccionaron aquellas cajas viables, es decir, con un número de colonias entre 30-300; tal como se muestra en la Tabla 6-3 a continuación.

Tabla 6-3: Análisis microbiológico y conteo de colonias bacterianas

 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS 								
Dilución	N° Muestra	N° colonias (UFC)	Viabil.	N° especies	N° Muestra	N° colonias (UFC)	Viabil.	N° especies
10^{-1}	M1	206	+	8	M2	115	+	4
10^{-2}	M1	139	+	4	M2	82	+	3
10^{-3}	M1	85	+	3	M2	58	+	2
10^{-4}	M1	36	+	3	M2	45	+	2
10^{-5}	M1	22	-	**	M2	14	-	**
10^{-6}	M1	9	-	**	M2	7	-	**

10 ⁻⁷	M1	0	-	**	M2	0	-	**
10 ⁻⁸	M1	0	-	**	M2	0	-	**
10 ⁻⁹	M1	0	-	**	M2	32	+	1
10 ⁻¹⁰	M1	0	-	**	M2	0	-	**

Realizado por: Medina, Edinson, 2022

Se observa un crecimiento en las cajas sembradas a partir de las diluciones 10⁻¹ hasta 10⁻⁶, recalcando que las dos últimas no son viables ya que el número de colonias contabilizadas es menor a 30, por lo que son descartadas para el proceso de aislamiento y purificación. Por otro lado, las cuatro primeras cajas son seleccionadas para aislar las cepas bacterianas de interés. Obsérvese que en la muestra M2, dilución 10⁻⁹ existió crecimiento bacteriano volviendo viable a la caja, por lo que también se considera para el siguiente proceso.



Ilustración 3-3: Crecimiento bacteriano heterogéneo en cajas Petri. a) M1, 10⁻² y b) M2, 10⁻¹

Realizado por: Medina, Edinson, 2022

3.3.2. *Aislamiento y purificación de cepas*

Se realizó un total de 4 ciclos de aislamiento y purificación hasta obtener cultivos bacterianos netamente puros, siendo el sembrado a partir de las diluciones seriadas el primero. Para el segundo aislamiento se empleó una nomenclatura para cada una de las cajas, el cual detalla la procedencia del aislado, en donde el primer término representa el ciclo de aislamiento, el segundo es el valor de dilución y el tercero es el número de especie aislada de esa caja a dicha dilución, cabe recalcar que ya no se hace una diferenciación por número de muestras ya que se busca un aislamiento

representativo de todo el relave minero. La Tabla 7-3 describe el nuevo conteo de especies posterior al segundo aislamiento.

Tabla 7-3: Segundo ciclo de aislamiento y purificación de cepas bacterianas

 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS 		
Caja	N° especies	Resiembra
2,-1,1°	1	+
2,-1,2°	4	-
2,-1,3°	3	-
2,-1,4°	2	+
2,-1,5°	3	-
2,-1,6°	2	+
2,-1,7°	2	+
2,-1,8°	2	+
2,-2,1°	3	+
2,-2,2°	2	+
2,-2,3°	1	+
2,-2,4°	2	+
2,-3,1°	3	+
2,-4,1°	2	+
2,-9,1°	1	+
+: Resiembra positiva (Se emplean para el siguiente ciclo de aislamiento)		
-: Resiembra negativa (No se emplean para el siguiente ciclo de aislamiento)		

Realizado por: Medina, Edinson, 2022

Para el tercer aislamiento se emplearon las cajas con resiembra positiva del ciclo anterior ya que es en estas donde se identificó especies macroscópicamente diferentes, obteniendo así la siguiente tabla, donde se mantiene la misma nomenclatura y se aumenta un cuarto termino que representa el número de especie aislada de aquella caja, tal como se muestra en la Tabla 8-3 a continuación.

Tabla 8-3: Tercer ciclo de aislamiento y purificación de cepas bacterianas

 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS 		
Caja	N° especies	Resiembra
3,-1,1°,1	1	**
3,-1,4°,1	2	-
3,-1,6°,1	3	+
3,-1,6°,2	2	+
3,-1,7°,1	2	+
3,-1,8°,1	3	+

3,-1,8°,2	1	**
3,-2,1°,1	1	-
3,-2,1°,2	2	+
3,-2,1°,3	1	-
3,-2,2°,1	3	-
3,-2,2°,2	2	-
3,-2,3°,1	1	**
3,-2,4°,1	2	+
3,-2,4°,2	2	-
3,-3,1°,1	1	-
3,-3,1°,2	1	-
3,-3,1°,3	1	-
3,-4,1°,1	2	+
3,-4,1°,2	2	+
3,-9,1°,1	1	**
+: Resiembra positiva (Se emplean para el siguiente ciclo de aislamiento)		
-: Resiembra negativa (No se emplean para el siguiente ciclo de aislamiento)		
**: Cajas marcadas para caracterización morfológica directa por presencia de una sola especie.		

Realizado por: Medina, Edinson, 2022

Finalmente se realizó un cuarto aislamiento con las cajas marcadas con resiembra positiva, en donde se obtuvo cultivos puros en cada una de las cajas cultivadas, para lo cual se realizó una caracterización más detallada, aquí se consideraron parámetros como: color, forma, borde, elevación, textura y brillo. Cabe recalcar que las cajas marcadas con ** se caracterizaron directamente ya que se contabilizó una única especie, por lo que se consideró como cultivos puros. En la Tabla 9-3 se describen las características macroscópicamente observadas en cada uno de los aislamientos, tal como se muestra a continuación.

Tabla 9-3: Caracterización morfológica de cepas bacterianas

AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS						
Caja	Color	Forma	Borde	Elevación	Textura	Brillo
3,-1,1°,1	Blanco	Irregular	Lobulado	Plana	Rugosa	Sin brillo
3,-1,8°,2	Amarillo	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Brillante
3,-2,3°,1	Amarillo	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Brillante
3,-9,1°,1	Blanco	Irregular	Lobulado	Plana	Rugosa	Sin brillo
4,-1,6°,1,1	Blanco	Irregular	Lobulado	Plana	Lisa	Brillante
4,-1,6°,1,2	Amarillo	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Brillante
4,-1,6°,1,3	Superficie completamente blanca, no se identifica una forma específica, plana, lisa, sin brillo.					
4,-1,6°,2,1	Amarillo	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Brillante
4,-1,6°,2,2	Amarillo (fuerte)	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Sin brillo
4,-1,6°,2,3	Amarillo	Circular	Entero	Elevada	Lisa	Brillante
4,-1,7°,1,1	Amarillo	Circular	Entero	Convexa	Lisa	Sin brillo

4,-1,7°1,2	Se identifica 2 colonias					
4,-1,8°,1,1	Se identifica 2 colonias					
4,-1,8°,1,2	Se identifica 2 colonias					
4,-2,1°,2,1	Blanco	Filamentosa	Filamentoso	Plana	Rugosa	Sin brillo
4,-2,1°,2,2	Amarillo	Circular (pequeñas)	Entero	Elevada	Lisa	Brillante
4,-2,4°,1,1	Amarillo	Irregular	Rizado	Plana	Rugosa	Brillante
4,-4,1°,1,1	Blanco	Rizoide	Rizoide	Plana	Lisa	Brillante

Realizado por: Medina, Edinson, 2022

Por tanto, se aisló un total de 15 especies bacterianas del relave minero, de estas especies identificadas se seleccionaron únicamente 8, las cuales presentan las características macroscópicas y morfológicas diferentes entre sí, lo cual fue el criterio para ser caracterizadas molecularmente. Su nomenclatura es sustituida por una letra y un número para facilitar su escritura, tal como se muestra en la Tabla 10-3 a continuación:

Tabla 10-3: Cepas bacterianas seleccionadas para caracterización molecular

AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE CEPAS BACTERIANAS	
Cajas Seleccionadas	Nomenclatura simplificada (En)
3,-1,1°,1	E1
3,-2,3°,1	E2
3,-9,1°,1	E3
4,-1,6°,1,1	E4
4,-1,6°,2,3	E5
4,-1,7°,1,1	E6
4,-2,1°,2,1	E7
4,-2,1°,2,2	E8
*En: Especie n-ésima	

Realizado por: Medina, Edinson, 2022

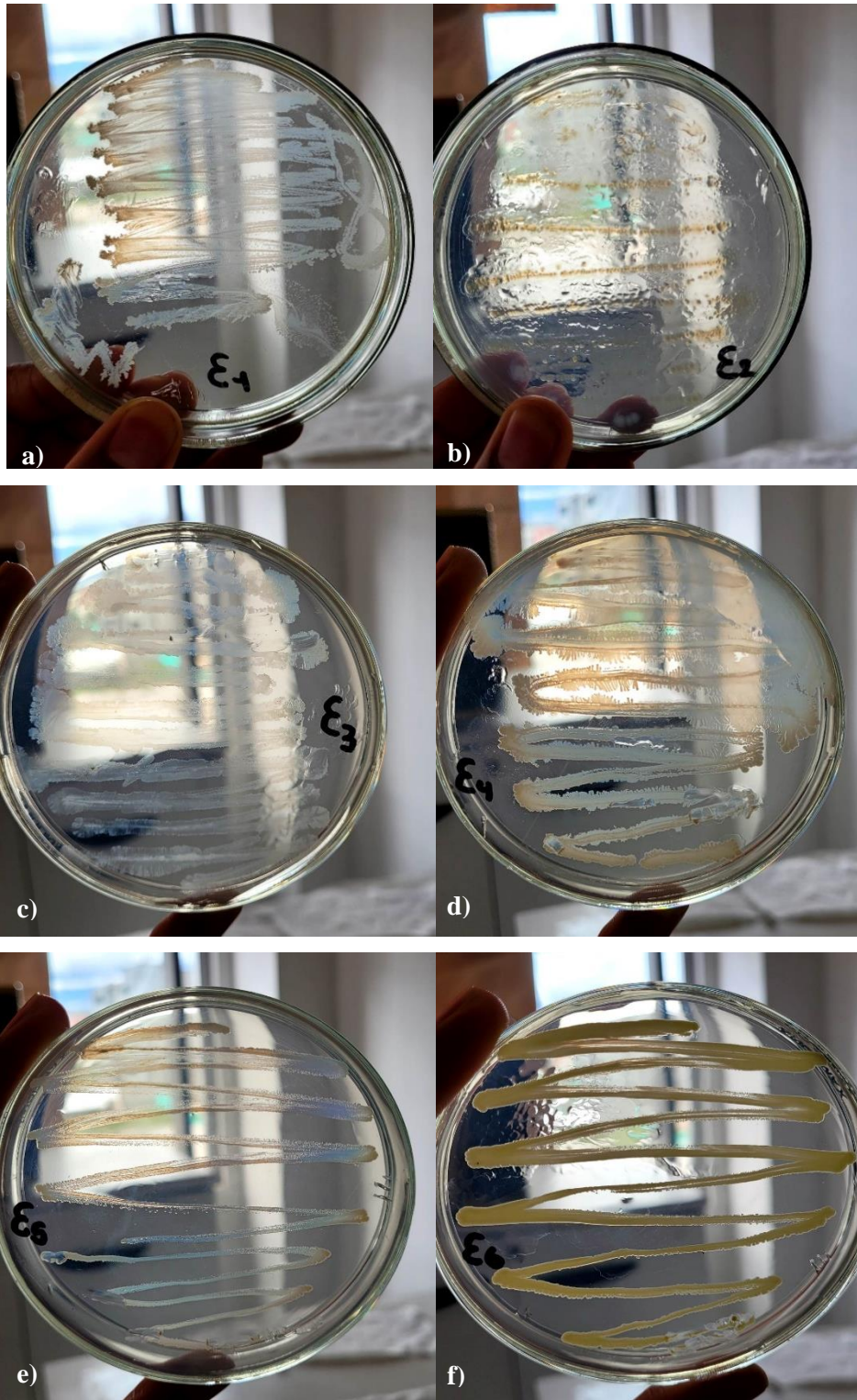


Ilustración 4-3: Cepas bacterianas para caracterización molecular. a) E1, b) E2, c) E3, d) E4, e) E5 y f) E6.

Realizado por: Medina, Edinson, 2022

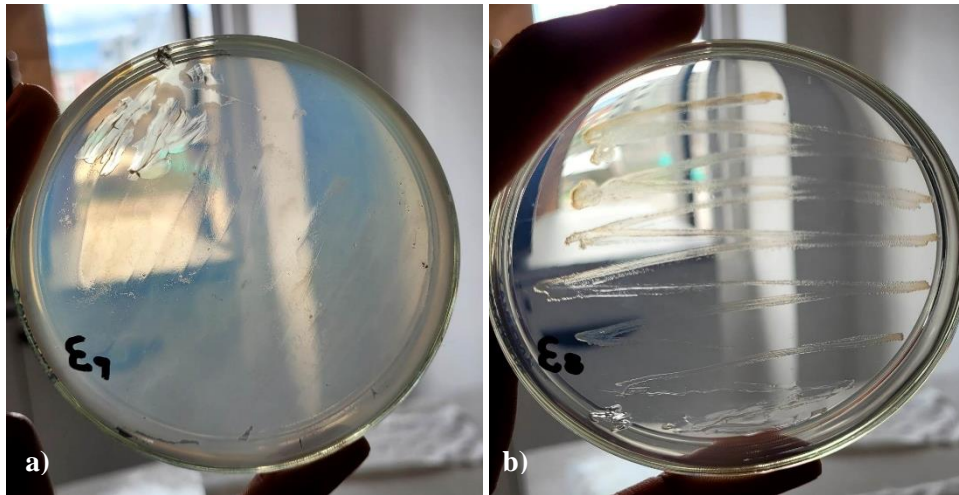


Ilustración 5-3: Cepas bacterianas para caracterización molecular. a) E7 y b) E8.

Realizado por: Medina, Edinson, 2022

3.4. Fase IV: Caracterización molecular de cepas bacterianas

Para tener una mayor seguridad de que las 8 cepas seleccionadas corresponden a especies diferentes se realizaron pruebas de tinción Gram y movilidad para obtener características adicionales a las ya descritas. Es así como las pruebas de tinción Gram arrojaron los siguientes datos.

Tabla 11-3: Tinción Gram

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS BACTERIANAS		
Cepa Bacteriana	Tinción Gram	Morfología
E1	-	Bacilos
E2	-	Cocos
E3	+	Bacilos
E4	+	Bacilos
E5	+	Estafilococos
E6	+	Cocos
E7	+	Bacilos
E8	-	Cocobacilos
+: Grampositivo		
-: Gramnegativo		

Realizado por: Medina, Edinson, 2022

Se identificó 5 especies como Grampositivas, es decir, presentaron una coloración violeta-morada debido a la retención del colorante en la membrana celular cuya cantidad de peptidoglucano es mayor que en las 3 especies restantes identificadas como Gramnegativas cuya coloración es rosa.

Por otro lado, la morfología bacteriana describe que principalmente se observan cocos y bacilos, haciendo una diferenciación por tamaños, como el caso de la cepa E3 y E7 que presentan una mayor longitud celular frente a las cepas E1 y E4; y por agrupaciones como la cepa E5 que forma racimos alargados (estafilococos). En el caso de las cepas E2 y E6 se observan células individuales circulares (cocos) y la cepa E8 son también circulares pero su tamaño es mayor pudiendo identificarse como cocobacilos, sin embargo, su dispersión es menor.

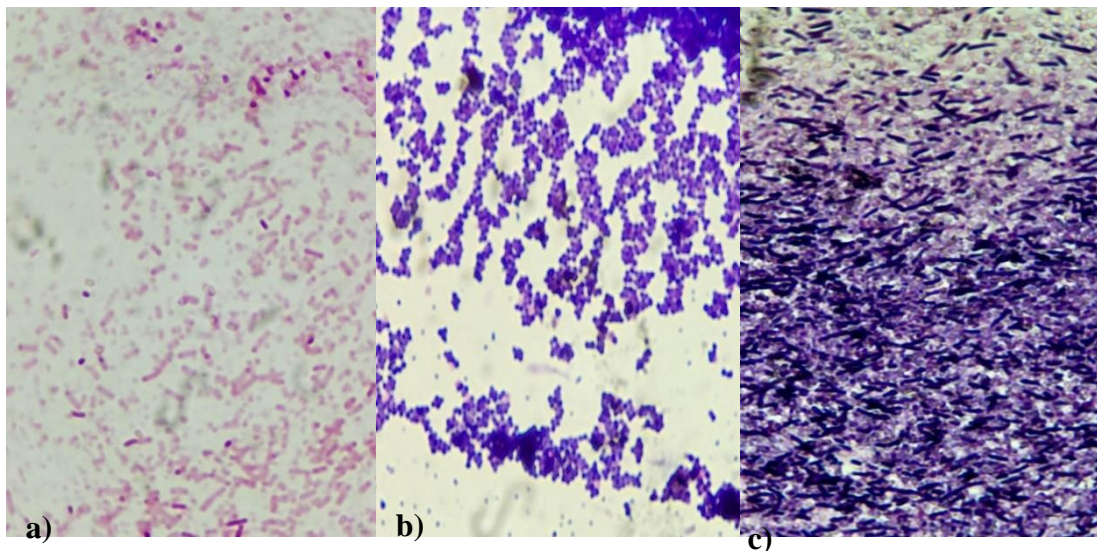


Ilustración 6-3: Tinción Gram. a) Bacilos gramnegativos (E1), b) Estafilococos grampositivos (E5) y c) Bacilos grampositivos (E3).

Realizado por: Medina, Edinson, 2022

Posterior a ello se realizaron pruebas de movilidad donde cada muestra se sembró en tubos con agar SIM por triplicado, dichos resultados se describen en la Tabla 12-3.

Tabla 12-3: Pruebas de movilidad bacteriana

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS BACTERIANAS			
Cepa Bacteriana	R1	R2	R3
E1	+	+	+
E2	+	+	+
E3	+	+	+
E4	-	-	-
E5	-	-	-
E6	-	-	-
E7	+	+	+
E8	+	+	+

**Rn: Repetición e-nésima*

Realizado por: Medina, Edinson, 2022

Para la prueba de movilidad, 5 de las especies evaluadas presentan actividad de movilidad ya que existió crecimiento de forma lateral respecto a la punción de inoculación; por ende, se asume que poseen al menos un flagelo que les permite desplazarse por el medio de cultivo. Por otro lado, las 3 cepas restantes no presentaron movilidad ya que su crecimiento fue únicamente en la línea de punción en el centro del medio de cultivo.



Ilustración 7-3: Prueba de movilidad positiva en E1, E2, E3, E7 y E8 (de derecha a izquierda).

Realizado por: Medina, Edinson, 2022

3.4.1. Caracterización molecular y secuenciación

Para la caracterización molecular se obtuvo ADN con una alta calidad entre el 90% y 100% para el proceso de amplificación de los fragmentos 16s y rpoB, en donde se visualizó bandas de aproximadamente 1500 pb y 1200 pb, respectivamente. A continuación, se muestran los resultados de la electroforesis en las muestras E1, E2, E4, E5, E6, E7 y E8 (Figura 8-3) obtenidos con los primers 27F/1492R. Por otro lado, la Figura 9-3 muestra la electroforesis para la muestra E3 obtenida con los primers rpoB-F/rpoB-R.

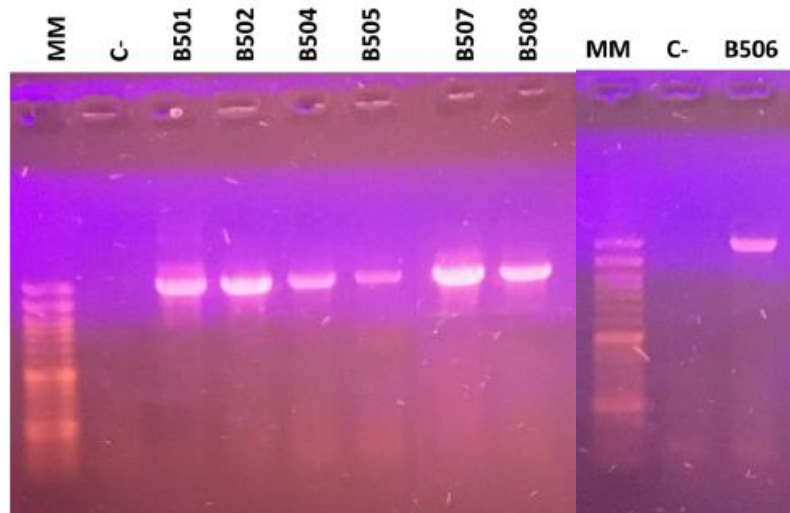


Ilustración 8-3: Resultados de la electroforesis para los amplicones obtenidos con los primers 27F/1492R para 6 de las muestras. *MM: Marcador de peso molecular ABM 100pb plus opti DNA maker

Realizado por: Medina, Edinson, 2022



Ilustración 9-3: Resultados de la electroforesis para los amplicones obtenidos con los primers rpoB-F/rpoB-R para la muestra E3. *MM: Marcador de peso molecular ABM 100pb plus opti DNA maker

Realizado por: Medina, Edinson, 2022

Posteriormente se obtuvo secuencias ensambladas de alta calidad a partir de las lecturas de la secuenciación basada en el método Sanger, las cuales se muestran a continuación. Cabe recalcar que para la muestra E1 no se obtuvo resultados por el método Sanger de secuenciación, por lo que se recurrió a la secuenciación de alto rendimiento para una correcta lectura y ensamblaje.

3.4.1.1. *Muestra E1: secuencia de ADN*

CACCCCAGTCATGAATCACTCCGTGGTAACCGTCCCCCGAAGGTTAGACTAGCTA
CTTCTGGAGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAA
CGTATTCACCGTGACATTCTGATTCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTC
GAGTTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCACCTCG
CGGCTTGGCAACCCTTTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGCCGTAA
GGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCTC
CTTAGAGTGCCACCATTACGTGCTGGTAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTAC
GGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTG
TCTGAGCTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCAGCATGTCAAGGCC
AGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGG
CCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCGTAICTCCCCAGGCGGTCAACT
TAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAGTTCTCAAGGAACCCAACGGCTAGTTGACATCG
TTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACC
TCAGTGTCAGTATCAGTCCAGGTGGTTCGCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATC
TACGCATTTACCCGCTACACAGGAAATCCACCACCCTCTACCGTACTCTAGCTCGC
CAGTTTTGGATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCGGGGCTTTCACATCCAACCTAACGA
ACCACCTACGCGCGCTTTACGCCAGTAATCCGATTAACGCTTGACCCCTTCGTAT
TACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAGCCGGTGTATTCTGTGCGGTAACGTCAAAA
CACTAACGTATTAGGTTAATGCCCTTCCTCCCAACTTAAAGTGCTTTACAATCCGAA
GACCTTCTTCACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAATATT
CCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGACTGAT
CATCCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACTA
GCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGCAAGGCCCGAAGGTCCCCTGCTTTCTC
CCGTAGGACGTATGCGGTATTAGCGTTCCTTTCGGAACGTTATCCCCACTACCAGG
CAGATTCCTAGGCATTAICTACCCGTCGCGCGCTAAATCAAGGAGCAAGCTCCTCT
CATCCGCTCGACTTGCATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCAAT

3.4.1.2. *Muestra E2: secuencia de ADN*

TCCAACCTAACGAACCACCTACGCGCGCTTTACGCCAGTAATCCGATTAACGCTT
GCACCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAARTTAGCCGGTGTATTCTGTGCG
GTAACGTCAAAAACACTAACGTATTAAGGTTAATGCCCTTCCTCCCAACTTAAA

3.4.1.3. *Muestra E3: secuencia de ADN*

CCTGAAACAGGGAAGGTAACGGGCAGAATCGATTACTTAACTGCTGATGAAGAGG
ATAACTATGTTGTGCTCAAGCGAATGCTCGTCTTGATGACGAAGGCGCCTTTATTG
ATGACAGCATCGTAGCTCGTTTTCCGCGGGGAGAACACCGTTGTTTCCAGAAATCGT
GTAGACTACATGGATGTATCGCCTAAGCAGGTTGTATCTGCTGCGACAGCATGTAT
CCCGTTCTTAGAAAACGATGACTCCAACCGTGCCCTCATGGGAGCGAACATGCAGC
GTCAGGCTGTGCCTTTGATGCAGCCGGAAGCGCCATTTGTTGGAACCTGGTATGGAA
TACGTATCAGGAAAAGACTCTGGTGCCGCTGTTATTTGTAAACACCCTGGTATCGTT
GAACGCGTAGAAGCCAAAACGTTTGGGTTTCGCCGTTATGAAGAAGTAGACGGTC

AAAAAGTAAAAGGAAACCTGGATAAATACAGCCTGCTGAAATTTGTCCGCTCTAAC
CAAGGTACGTGCTACAACCAGCGTCCGATCGTAAGTGTCGGCGATGAAGTGGTAAA
AGGAGAAATCCTTGCTGACGGTCCTTCTATGGAGCTTGGTGAACCTGCACTTGGCC
GTAACGTAATGGTTCGGCTTCATGACGTGGGATGGCTACAACCTATGAGGATGCCATC
ATCATGAGTGAACGCCTAGTGAAGGATGATGTTTATACATCTATCCACATTGAAGA
ATACGAATCAGAAGCACGTGATACGAACTTGGACCTGAAGAAATCACTCGCGAT
ATTCCAAACGTCGGTGAAGATGCGCTTCGCAATCTTGATGACCGCGGAATCATCCG
TATTGGGGCAGAAGTAAAAGACGGAGATCTTCTTGTGGTAAAGTAAACGCCTAAAG
GCGTAACTGAACTGACTGCCGAAGAACGCCTTCTTACGCCATCTTTGGCGAGAAA
GCCCAGGAGGTTCTGTGATACTTCTTCTTCTGTGTCCTCATGGCGGCGGCGGAATTATC
CATGACGTAAAGTCTTCAACCGTGAA

3.4.1.4. Muestra E4: secuencia de ADN

AACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTC
TGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCAAGCAGTACTCTTGCACTTGTCTTCCCTAACAA
CAGAGCTTACGATCCGAAGACCTTCATCACTC

3.4.1.5. Muestra E5: secuencia de ADN

TCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTCAACCTAGAGTGCCCAACTTAATGATGGCAACT
AAGCTTAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCT
GACGACAACCATGCACCACCTGTCACTTTGTCCCCGAAGGGGAAGGCTCTATCTC
TAGAGTTTTCAAAGGATGTCAAGATTTGGTAAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTA
ACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTG
CGGTCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGG
AAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAA
TCCTGTTTGTATCCCCACGCTTTCGCACATCAGCGTCAGTTACAGACCAGAAAGTCG
CTTCGCCACTGGTGTTCCTCCATATCTCTGCGCATTTACCGCTACACATGGAATTC
CACTTCTCTTCTGCACTCAAGTTTCCCAGTTTCCAATGACCTCCACGGTTGAGC
CGTGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTACGCGCGCTTACGCCAATAA
TTCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCG
TGGCTTCTGATTAGGTACCGTCAAGACGTGCACAGTACTTACACGTTTGTCTTC
CCTAATAACAGAGTTTTACGAGCCGA

3.4.1.6. Muestra E6: secuencia de ADN

GTTGACCCCGGCAGTCTCCATGAGTCCCCACCACGACGTGCTGGCAACATGGAAC
GAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGAC
AACCATGCACCACCTGTGAACCCGCCCAAAGGGGAACCGTATCTCTACGGCGAT
CGAGAACATGTCAAGCCTTGGTAAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCGCAT
GCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTGTAGCCTTGGCGGCCGT
ACTCCCCAGGCGGGGCACTTAATGCGTTAGCTGCGGCGCGGAAACCGTGGAATGGT
CCCCACACCTAGTGCCCAACGTTTACGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT
CGTCCCCATGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGCCCAGAGACCTGCCTTCGCC

ATCGGTGTTCCCTCCTGATATCTGCGCATTCCACCGCTACACCAGGAATTCCAGTCTC
CCCTACTGCACTCTAGTCTGCCCCGTACCCACCGCAGATCCGGGGTTAAGCCCCGGA
CTTTCACGACAGACGCGACAAACCGCCTACGAGCTCTTTACGCCAATAATTCCGG
ATAACGCTCGCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTT
CTTCTGCAGGTACCGTCACTTTCGCTTCTTCCCTACTGAAAGAGGTTTACAACCCGA
AGGCCGTCATCCCTCACGCGGCGTGCCTGCATCA

3.4.1.7. *Muestra E7: secuencia de ADN*

TCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCCTCTGCCCCGAAGGGG
ACGTCCTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTT
GCTTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGA
GTTTCAGTCTTGCAGCCGTAATCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCA
CTAAGGGGGCGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTKTACGGCGTGGACTACC
AGGGTATCTAATCCTGTTTCGCTCCCCACGCTWTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGAC
CAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTAC
ACGTGGAATTCCTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTC
CCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAAACCGCCTGCGAGCCCTTT
ACGCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCA
CGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTACCGCCCTATTGAACG
GTAATTTGTTCTTCCCTAACAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACG
CG

3.4.1.8. *Muestra E8: secuencia de ADN*

CAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGA
CAGCCATGCAGCACCTGTGTTACGGCTCTCTTTCGAGCACGAAGCCATCTCTGGCA
ACTTCCGTACATGTCAAAGGTGGGTAAGGTTTTTCGCGTTGCATCGAATTAACCAC
ATCATCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGC GGCC
GTAATCCCCAGGCGGTCAACTTCACGCGTTAGCTTCGTTACTGAGTCAGAAGAGAC
CCAACAACCAGTTGACATCGTTTAGGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTT
GCTCCCCACGCTTTCGTGCATGAGCGTCAGTGCAGGCCAGGGGATTGCCTTCGCC
ATCGGTGTTCCCTCCGCATATCTACGCATTTCACTGCTACACGCGGAATTCATCCCC
CTCTGCCGCACTCCAGCTTTGCAGTCACAAGCGCCATTCCCAGGTTGAGCCGGGG
ATTTACGCGCTGTCTTACAAAACCGCCTGCGCACGCTTTACGCCAGTAATTCGGAT
TAACGCTTGCACCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGCTTA
TTCTTACGGTACCGTCATTAGCCCCGGGTATTAACCAGAGCCGTTTCGTTCCGTACA
AAAGCAGTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCCCTGCACGCGGCATTGCTGGATCAGGC
TTGCGCCCATTGTC

Las secuencias antes descritas se ingresaron individualmente en el software Blastn by NCBI para la identificación molecular. Por tanto, la Tabla 13-3 a continuación describe las especies bacterianas identificadas y su porcentaje de coincidencia con la base de datos.

Tabla 13-3: Identificación de cepas bacterianas en el software Blast by NCBI

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS BACTERIANAS					
Muestra	Calidad ADN	Longitud (pb)	Fragmento	Organismo	% de identidad
E1	95,6	1459	16s	<i>Pseudomonas chengduensis</i>	100,0
E2	89,8	168	16s	<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	98,80
E3	99,8	1035	rpoB	<i>Bacillus subtilis</i>	100,0
E4	94,6	147	16s	<i>Bacillus altitudinis</i>	99,32
E5	100	762	16s	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	100,0
E6	99,7	768	16s	<i>Micrococcus aloeverae</i>	100,0
E7	99,9	683	16s	<i>Bacillus subtilis</i>	99,71
E8	99,7	749	16s	<i>Hydrogenophaga laconesensis</i>	99,60

Fuente: (Flores, 2022, p.1)

Realizado por: Medina, Edinson, 2022

Adicionalmente, se corroboró que las características tanto morfológicas como de diferenciación de las especies identificadas molecularmente sean correspondientes con información bibliográfica. Es así que para la especie E1 identificada como *Pseudomonas chengduensis*, (Zouagui et al., 2022, p.1) menciona que corresponde a una especie gramnegativa y con movilidad, concordando también con (Yumoto et al., 2001, pp. 350-351) quien habla de la especie E2 caracterizada como *Pseudomonas alcaliphila* que comparte estas mismas características, pues se habla de un mismo género bacteriano. Por otro lado, (Van Dijnl & Hecker, 2013, pp. 1-2) menciona que la especie *Bacillus subtilis* corresponde a una especie grampositiva y sin movilidad, por lo que se constata que las cepas E3 y E7 presentan estas características. Así también la especie E4 comparte esta descripción ya que pertenecen al mismo género, concordando con (Asmani et al., 2020, p. 3). Para la cepa E5 identificada como *Staphylococcus saprophyticus*, presentó movilidad negativa y se diferenció como grampositiva, coincidiendo con lo mencionado por (Raz, et al., 2005, p. 896) que además establece que es un organismo patógeno que no puede sobrevivir fuera de un huésped animal, por lo que su presencia en un relave minero es contradictoria, pudiéndose optar por investigar su procedencia. En el caso de la cepa E6, esta se caracterizó como *Micrococcus aloeverae* las cuales presentan un color amarillento característico, pertenecen al grupo de grampositivas y carece de movilidad, tal como menciona (Prakash et al., 2014, pp. 3427-3428). Finalmente, (Mantri, et al., 2016, p. 638) mencionan que la especie *Hydrogenophaga laconesensis* fue caracterizada como gramnegativa, con movilidad y en forma de bacilos pequeños, concordando con lo obtenido en el presente estudio.

3.5. Fase V: Pruebas de degradación de contaminantes

Los tubos enriquecidos con mercurio y cianuro e inoculados con las cepas bacterianas, se dejaron incubando durante 5 días. Transcurrido este tiempo, me inició midiendo la densidad celular por medio de espectrofotometría para determinar el crecimiento celular en unidades de UFC/ml empleando la escala de McFarland.

Se midió la absorbancia de los estándares de McFarland para obtener una curva de calibración y una expresión matemática que correlacione la absorbancia con el número de células, tal como se muestra en la tabla 14-3 a continuación.

Tabla 14-3: Escala de McFarland

PRUEBAS DE TOLERANCIA				
Escala De McFarland				
N° Estándar McFarland	BaCl ₂ (1%)	H ₂ SO ₄ (1%)	N° Células (1x10 ⁸ UFC/ml)	Absorbancia (a 600nm)
0,5	0,05	9,95	1,5	0,097
1	0,1	9,90	3	0,236
2	0,2	9,80	6	0,422
3	0,3	9,70	9	0,584
4	0,4	9,60	12	0,745
5	0,5	9,50	15	0,934
6	0,6	9,40	18	1,106
7	0,7	9,30	21	1,272
8	0,8	9,20	24	1,424
9	0,9	9,10	27	1,588
10	1,0	9,00	30	1,775

Realizado por: Medina, Edinson, 2022

La ilustración 10-3 muestra la correlación entre la absorbancia y el número de células en los estándares McFarland, a partir del cual se obtiene la expresión matemática que nos permite calcular la densidad celular en las muestras bajo estudio a las cuales se les midió la absorbancia.

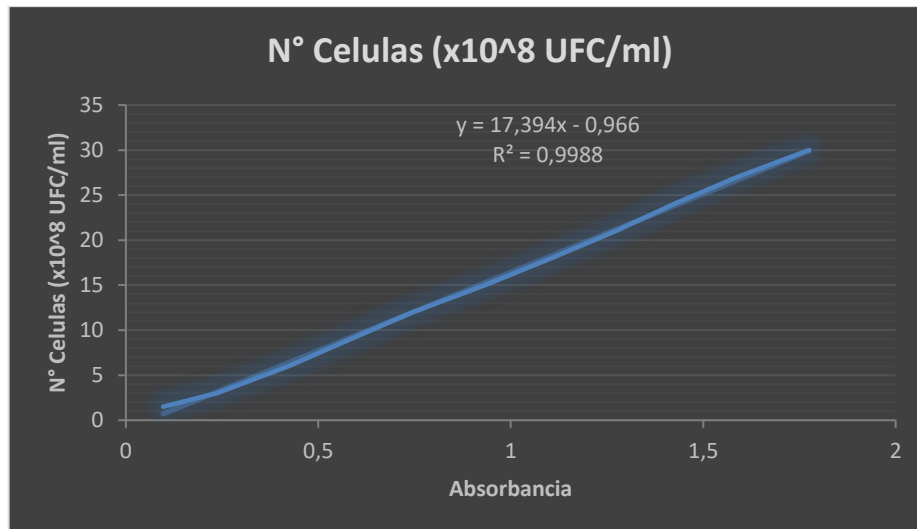


Ilustración 10-3: Curva de calibración de la escala de McFarland

Realizado por: Medina, Edinson, 2022

La correlación entre estas dos variables arrojó un valor de 0,9988; es decir, se hayán relacionadas de forma directamente proporcional con pendiente positiva cercana a 1. La expresión matemática obtenida se describe como: $y = 17,394x - 0,966$; en donde: y es el número de células medidas en UFC/ml y x es la absorbancia medida a 600nm por espectrofotometría. Se emplea esta ecuación únicamente para valores de absorbancia mayores a 0,142 ya que a partir de este se tiene valores que se ajustan a la ecuación y dicha linealidad permite calcular acertadamente la densidad celular. Por otro lado, para valores inferiores a dicho limite se empleará una relación directa con el estándar de McFarland 0,5; para que la estimación de UFC/ml sea correcta.



Ilustración 11-3: Estándares de la escala de McFarland

Fuente: (Cervants, 2016, p.1)

Realizado por: Medina, Edinson, 2022

3.5.1. Pruebas de degradación en medio con cianuro

Para el medio cianurado, se registró las absorbancias y se calculó las densidades celulares tal como se muestra en la Tabla 15-3 a continuación.

Tabla 15-3: Densidad celular en medio con cianuro

PRUEBAS DE DEGRADACIÓN					
Densidad Celular en Medio con Cianuro					
Cepa Bacteriana	Concentración	Repetición	Absorbancia	N° Células (x10⁸ UFC/ml)	Media
E1	C1	R1	0,063	0,97	0,95
		R2	0,062	0,96	
		R3	0,060	0,93	
	C2	R1	0,064	0,99	1,01
		R2	0,065	1,01	
		R3	0,067	1,04	
	C3	R1	0,077	1,19	1,22
		R2	0,079	1,22	
		R3	0,080	1,24	
E2	C1	R1	0,100	1,55	1,55
		R2	0,102	1,58	
		R3	0,099	1,53	
	C2	R1	0,133	2,06	2,06
		R2	0,131	2,03	
		R3	0,135	2,09	
	C3	R1	0,087	1,35	1,34
		R2	0,088	1,36	
		R3	0,085	1,31	
E3	C1	R1	0,045	0,70	0,68
		R2	0,042	0,65	
		R3	0,044	0,68	
	C2	R1	0,043	0,66	0,68
		R2	0,045	0,70	
		R3	0,044	0,68	
	C3	R1	0,049	0,76	0,79
		R2	0,052	0,80	
		R3	0,053	0,82	
E4	C1	R1	0,122	1,89	1,88
		R2	0,119	1,84	
		R3	0,124	1,92	
	C2	R1	0,104	1,61	1,59
		R2	0,103	1,59	
		R3	0,101	1,56	
	C3	R1	0,133	2,06	2,05

		R2	0,130	2,01	
		R3	0,135	2,09	
E5	C1	R1	0,094	1,45	1,48
		R2	0,098	1,52	
		R3	0,096	1,48	
	C2	R1	0,093	1,44	1,40
		R2	0,090	1,39	
		R3	0,089	1,38	
	C3	R1	0,077	1,19	1,22
		R2	0,079	1,22	
		R3	0,080	1,24	
E6	C1	R1	0,074	1,14	1,11
		R2	0,071	1,10	
		R3	0,070	1,08	
	C2	R1	0,100	1,55	1,56
		R2	0,103	1,59	
		R3	0,099	1,53	
	C3	R1	0,117	1,81	1,84
		R2	0,120	1,86	
		R3	0,119	1,84	
E7	C1	R1	0,107	1,65	1,65
		R2	0,105	1,62	
		R3	0,109	1,69	
	C2	R1	0,084	1,30	1,28
		R2	0,083	1,28	
		R3	0,081	1,25	
	C3	R1	0,091	1,41	1,44
		R2	0,094	1,45	
		R3	0,095	1,47	
E8	C1	R1	0,134	2,07	2,11
		R2	0,136	2,10	
		R3	0,139	2,15	
	C2	R1	0,156	2,41	2,39
		R2	0,155	2,40	
		R3	0,152	2,35	
	C3	R1	0,145	2,24	2,25
		R2	0,148	2,29	
		R3	0,144	2,23	

Realizado por: Medina, Edinson, 2022

Es así como en el medio con cianuro se obtuvo densidades celulares menores a $2,41 \times 10^8$ UFC/ml, siendo esta el valor más alto alcanzado por la especie *Hydrogenophaga laconesensis* (E8). A esta le siguen las especies *Bacillus altitudinis* (E4) y *Pseudomonas alcaliphila* (E2) con densidades celulares medias iguales a $1,84 \times 10^8$ UFC/ml y $1,65 \times 10^8$ UFC/ml. Para las especies *Micrococcus aloeverae* (E6) y *Staphylococcus saprophyticus* (E5), las densidades celulares medias alcanzaron

valores de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml y $1,37 \times 10^8$ UFC/ml, respectivamente. Y finalmente las especies con menor desarrollo celular fueron *Pseudomonas chengduensis* (E1) y *Bacillus subtilis* (E3) cuyas densidades celulares son iguales a $1,06 \times 10^8$ UFC/ml y $0,72 \times 10^8$ UFC/ml, respectivamente. Cabe recalcar que la muestra E7 logró un desarrollo celular más elevado ($1,46 \times 10^8$ UFC/ml) frente a la cepa E3, pese a tratarse de la misma especie.

Obsérvese que las cepas bacterianas en el medio cianurado tuvieron un desarrollo celular menor que en el medio con mercurio, por lo que se puede esperar una baja resistencia a este contaminante, por el hecho de que inicialmente el suelo de donde se aislaron no presentaba contaminación por cianuro, por ende, estas no se hallaban naturalmente en presencia de cianuro y no desarrollaron características que les permita asimilarlo.

Los porcentajes de degradación que se obtuvo con las cepas bacterianas en medio con cianuro se describen detalladamente en la Tabla 16-3 a continuación.

Tabla 16-3: Porcentaje de degradación de cianuro

PRUEBAS DE DEGRADACIÓN								
Degradación en Medio con Cianuro								
Cepa Bacteriana	Concentración	Repetición	Concentración Inicial (mg/L)	Concentración Inicial Corregida(mg/L)	Concentración Final (mg/L)	Concentración Final Corregida (mg/L)	% Degradación	Media
E1	C1	R1	0,084	6,83	0,059	4,80	29,76	29,76
		R2	0,084	6,83	0,058	4,72	30,95	
		R3	0,084	6,83	0,06	4,88	28,57	
	C2	R1	0,099	8,04	0,067	5,44	32,32	32,32
		R2	0,099	8,04	0,065	5,28	34,34	
		R3	0,099	8,04	0,069	5,60	30,30	
	C3	R1	0,157	9,47	0,07	4,22	55,41	53,93
		R2	0,157	9,47	0,073	4,40	53,50	
		R3	0,157	9,47	0,074	4,46	52,87	
E2	C1	R1	0,084	6,83	0,077	6,26	8,33	8,73
		R2	0,084	6,83	0,076	6,18	9,52	
		R3	0,084	6,83	0,077	6,26	8,33	
	C2	R1	0,099	8,04	0,052	4,22	47,47	48,48
		R2	0,099	8,04	0,05	4,06	49,49	
		R3	0,099	8,04	0,051	4,14	48,48	
	C3	R1	0,157	9,47	0,053	3,20	66,24	64,76
		R2	0,157	9,47	0,055	3,32	64,97	
		R3	0,157	9,47	0,058	3,50	63,06	
E3	C1	R1	0,084	6,83	0,053	4,31	36,90	36,51
		R2	0,084	6,83	0,052	4,23	38,10	
		R3	0,084	6,83	0,055	4,47	34,52	

	C2	R1	0,099	8,04	0,051	4,14	48,48	49,49
		R2	0,099	8,04	0,049	3,98	50,51	
		R3	0,099	8,04	0,05	4,06	49,49	
	C3	R1	0,157	9,47	0,059	3,56	62,42	60,30
		R2	0,157	9,47	0,063	3,80	59,87	
		R3	0,157	9,47	0,065	3,92	58,60	
E4	C1	R1	0,084	6,83	0,064	5,20	23,81	24,21
		R2	0,084	6,83	0,061	4,96	27,38	
		R3	0,084	6,83	0,066	5,37	21,43	
	C2	R1	0,099	8,04	0,061	4,95	38,38	38,38
		R2	0,099	8,04	0,06	4,87	39,39	
		R3	0,099	8,04	0,062	5,04	37,37	
	C3	R1	0,157	9,47	0,079	4,77	49,68	47,98
		R2	0,157	9,47	0,081	4,89	48,41	
		R3	0,157	9,47	0,085	5,13	45,86	
E5	C1	R1	0,084	6,83	0,076	6,18	9,52	7,94
		R2	0,084	6,83	0,077	6,26	8,33	
		R3	0,084	6,83	0,079	6,42	5,95	
	C2	R1	0,099	8,04	0,085	6,90	14,14	14,14
		R2	0,099	8,04	0,082	6,66	17,17	
		R3	0,099	8,04	0,088	7,15	11,11	
	C3	R1	0,157	9,47	0,102	6,15	35,03	34,39
		R2	0,157	9,47	0,106	6,39	32,48	
		R3	0,157	9,47	0,101	6,09	35,67	
E6	C1	R1	0,084	6,83	0,068	5,53	19,05	17,06
		R2	0,084	6,83	0,069	5,61	17,86	
		R3	0,084	6,83	0,072	5,85	14,29	
	C2	R1	0,099	8,04	0,056	4,55	43,43	41,08

	C3	R2	0,099	8,04	0,058	4,71	41,41	66,24
		R3	0,099	8,04	0,061	4,95	38,38	
		R1	0,157	9,47	0,053	3,20	66,24	
		R2	0,157	9,47	0,05	3,02	68,15	
		R3	0,157	9,47	0,056	3,38	64,33	
E7	C1	R1	0,084	6,83	0,067	5,45	20,24	21,03
		R2	0,084	6,83	0,069	5,61	17,86	
		R3	0,084	6,83	0,063	5,12	25,00	
	C2	R1	0,099	8,04	0,061	4,95	38,38	38,72
		R2	0,099	8,04	0,057	4,63	42,42	
		R3	0,099	8,04	0,064	5,20	35,35	
	C3	R1	0,157	9,47	0,073	4,40	53,50	51,80
		R2	0,157	9,47	0,075	4,52	52,23	
		R3	0,157	9,47	0,079	4,77	49,68	
E8	C1	R1	0,084	6,83	0,075	6,10	10,71	12,70
		R2	0,084	6,83	0,071	5,77	15,48	
		R3	0,084	6,83	0,074	6,02	11,90	
	C2	R1	0,099	8,04	0,062	5,04	37,37	34,68
		R2	0,099	8,04	0,065	5,28	34,34	
		R3	0,099	8,04	0,067	5,44	32,32	
	C3	R1	0,157	9,47	0,094	5,67	40,13	39,92
		R2	0,157	9,47	0,097	5,85	38,22	
		R3	0,157	9,47	0,092	5,55	41,40	

Realizado por: Medina, Edinson, 2022

Se determinó que las cepas bacterianas lograron un porcentaje de degradación de cianuro entre 7,94% y 66,24%; recalando que dicho porcentaje fue menor en las muestras con la concentración inicial (C1) alcanzando un valor máximo de 36,51%; y aumentando considerablemente para las concentraciones C2 y C3, siendo esta última donde se registraron los valores más altos. La especie *Micrococcus aloeverae* (E6) fue la que alcanzó el valor más alto en la concentración C3 (66,24%), seguida por las especies *Pseudomonas alcaliphila* (E2) con un porcentaje máximo de 64,76%; *Bacillus subtilis* (E3 y E7) con 60,30% y 51,80% respectivamente; *Pseudomonas chengduensis* (E1) con 53,93% y *Bacillus altitudinis* (E4) con 47,98%. Finalmente, las especies con los porcentajes mínimos para la concentración C3, fueron *Hydrogenophaga laconesensis* (E8) con 39,92% y *Staphylococcus saprophyticus* (E5) con 34,39%.



Ilustración 12-3: Determinación de cianuro en pruebas de degradación. De izquierda a derecha: blanco C1; blanco C2; blanco C3; muestra C1, E2; muestra C2, E2; y muestra C3, E2.

Realizado por: Medina, Edinson, 2022

A pesar del grado de toxicidad que posee el cianuro, es un compuesto que puede ser sintetizado por distintos organismos, sean estos bacterias, hongos, plantas o animales, empleando la cianogénesis como mecanismo de supervivencia en medios contaminados. Park, J. et al. (2017) menciona que muchos organismos han desarrollado vías metabólicas para la degradación, transformación, asimilación o tolerancia al cianuro, pudiendo también emplearlo como única fuente de nitrógeno para su crecimiento. (Park, J. et al., 2017, p. 3029).

Luque-Almagro, V. et al. (2017) establece que dentro de las principales rutas enzimáticas se tiene las reacciones hidrolíticas, reductivas, oxidativas y de sustitución/transferencia. Las reacciones de oxidación producen directamente dióxido de carbono y amoníaco por la cianuro dioxigenasa

(Fig. 13-3, reacción 1) o en reacciones de dos pasos, vía cianato, ejecutadas por la cianuro monooxigenasa y la cianasa (Fig. 13-3, reacción 2 y 3, respectivamente). Las rutas reductoras incorporan la nitrogenasa que se requiere para la fijación de nitrógeno, la cual emplea sustratos con enlaces triples C-N como el cianuro de hidrógeno, nitrilos e isonitrilos para producir metano y amoníaco ((Fig. 13-3, reacción 4). El cianuro puede también ser reducido por la 3-cianoalanina sintasa que se hidroliza a amoníaco y aspartato (Fig. 13-3, reacción 12) o como asparagina como producto intermedio (Fig. 13-3, reacción 13-15). La rodanasa (tiosulfato: cianuro sulfotransferasa) genera la reacción entre el cianuro y el tiocianato para producir tiocianato y sulfito (Fig. 13-3, reacción 16). El tiocianato se degrada por dos vías a CO₂, amoníaco y sulfuro, pasando inicialmente a amoníaco y sulfuro de carbonilo por una ruptura hidrolítica (Fig. 13-3, reacción 17), hidrolizándose aún más a CO₂ y sulfuro (Fig. 13-3, reacción 18) que se oxida finalmente a sulfato. Se tiene la segunda vía para el tiocianato, generando cianato como intermedio; cuando el tiocianato se oxida mediante la tiocianato deshidrogenasa (tiocianato: citocromo c oxidoreductasa) pasa a cianato y azufre elemental con citocromo c actuando como receptor de electrones (Fig. 13-3, reacción 19). (Luque-Almagro et al., 2018, pp. 1067-1068)

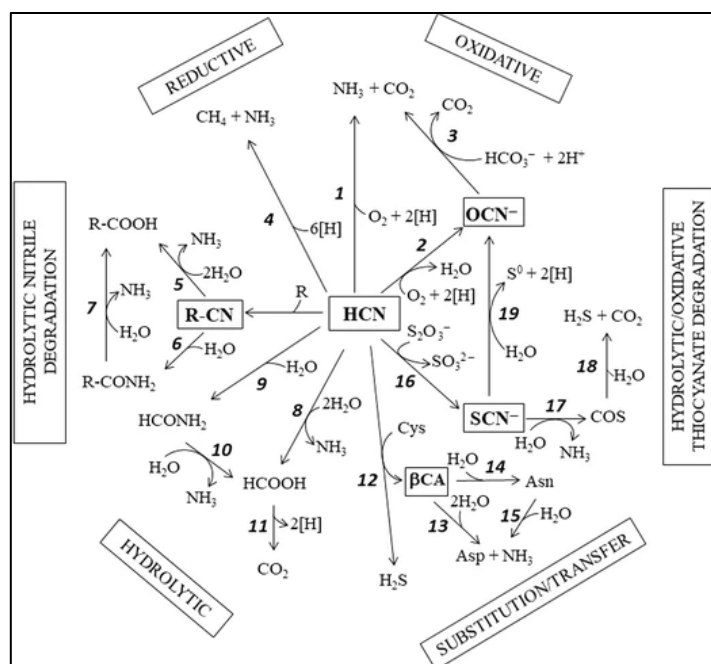


Ilustración 13-3: Rutas enzimáticas para la biodegradación de cianuro y ciano-derivados.

Fuente: (Luque-Almagro et al. 2018)

Los procesos hidrolíticos son catalizados por dos enzimas, la cianidasa que transforma el cianuro en amoníaco y ácido fórmico (Fig. 13-3, reacción 8); y la cianuro hidratasa que genera formamida (Fig. 13-3, reacción 9 y 10). La biodegradación de nitrilos requiere reacciones hidrolíticas que

producen amoníaco y el respectivo ácido carboxílico. Las nitrilasas hidrolizan directamente esta transformación (Fig. 13-3, reacción 5) y las nitrilo hidratasas generan un intermedio de amida que es hidrolizado por una amidasa (Fig. 13-3, reacción 6 y 7). (Luque-Almagro et al., 2018, p. 1069)

3.5.2. Pruebas en medio con mercurio

Con la expresión matemática antes mencionada, se calculó la densidad celular en las muestras con mercurio, cuyos valores se detallan en la Tabla 17-3 a continuación.

Tabla 17-3: Densidad celular en medio con mercurio

PRUEBAS DE DEGRADACIÓN					
Densidad Celular en Medio con Mercurio					
Cepa Bacteriana	Concentración	Repetición	Absorbancia	N° Células (x10⁸ UFC/ml)	Media
E1	C1	R1	0,182	2,20	2,18
		R2	0,176	2,10	
		R3	0,185	2,25	
	C2	R1	0,161	1,83	1,85
		R2	0,158	1,78	
		R3	0,166	1,92	
	C3	R1	0,185	2,25	2,30
		R2	0,188	2,30	
		R3	0,191	2,36	
E2	C1	R1	0,262	3,59	3,53
		R2	0,258	3,52	
		R3	0,256	3,49	
	C2	R1	0,177	2,11	2,16
		R2	0,182	2,20	
		R3	0,180	2,16	
	C3	R1	0,150	1,64	1,69
		R2	0,153	1,70	
		R3	0,155	1,73	
E3	C1	R1	0,073	1,13	1,12
		R2	0,074	1,14	
		R3	0,071	1,10	
	C2	R1	0,078	1,21	1,23
		R2	0,079	1,22	
		R3	0,081	1,25	
	C3	R1	0,079	1,22	1,23
		R2	0,077	1,19	
		R3	0,083	1,28	
E4	C1	R1	0,128	1,26	1,25
		R2	0,125	1,21	

	C2	R3	0,130	1,30	1,86
		R1	0,160	1,82	
		R2	0,164	1,89	
	C3	R3	0,163	1,87	1,77
		R1	0,158	1,78	
		R2	0,155	1,73	
E5	C1	R3	0,159	1,80	1,08
		R1	0,067	1,04	
		R2	0,070	1,08	
	C2	R3	0,072	1,11	1,29
		R1	0,128	1,26	
		R2	0,129	1,28	
	C3	R3	0,132	1,33	1,05
		R1	0,118	1,09	
		R2	0,116	1,05	
E6	C1	R3	0,113	1,00	2,34
		R1	0,186	2,27	
		R2	0,191	2,36	
	C2	R3	0,194	2,41	2,57
		R1	0,202	2,55	
		R2	0,205	2,60	
	C3	R3	0,203	2,56	1,50
		R1	0,141	1,49	
		R2	0,140	1,47	
E7	C1	R3	0,145	1,56	0,84
		R1	0,100	0,77	
		R2	0,103	0,83	
	C2	R3	0,108	0,91	1,03
		R1	0,110	0,95	
		R2	0,119	1,10	
	C3	R3	0,116	1,05	0,78
		R1	0,102	0,81	
		R2	0,100	0,77	
E8	C1	R3	0,099	0,76	1,47
		R1	0,138	1,43	
		R2	0,140	1,47	
	C2	R3	0,143	1,52	1,83
		R1	0,170	1,99	
		R2	0,145	1,56	
	C3	R3	0,168	1,96	2,28
		R1	0,183	2,22	
		R2	0,187	2,29	
		R3	0,190	2,34	

Realizado por: Medina, Edinson, 2022

Por tanto, se establece que durante los 5 días se consiguió un crecimiento celular menor a $3,53 \times 10^8$ UFC/ml en medio con mercurio, destacando las especies *Pseudomonas alcaliphila* (E2), *Micrococcus aloeverae* (E6), e *Hydrogenophaga laconesensis* (E8) con las más altas densidades celulares, recalando que esta última presentó mayor crecimiento con el aumento de la concentración, siendo un indicativo de una alta resistencia al contaminante. Las especies *Pseudomonas chengduensis* (E1) y *Bacillus altitudinis* (E4) presentaron densidades celulares entre $2,30 \times 10^8$ UFC/ml y $1,25 \times 10^8$ UFC/ml; y finalmente las especies con menor crecimiento fueron *Bacillus subtilis* (E3 y E7) y *Staphylococcus saprophyticus* (E5) con densidades celulares entre $0,78 \times 10^8$ UFC/ml y $1,29 \times 10^8$ UFC/ml.

De acuerdo con las pruebas de degradación a las que se sometieron todas las cepas bacterianas, se obtuvieron los siguientes valores, descritos en la Tabla 18-3, a continuación:

Tabla 18-3: Porcentajes de degradación en medio con mercurio

PRUEBAS DE DEGRADACIÓN							
Degradación en Medio con Mercurio							
Cepa Bacteriana	Concentración	Repetición	Concentración inicial (ppm)	Concentración Final (ppb)	Concentración Final (ppm)	% Degradación	Media (%)
E1	C1	R1	10,0	1033,539	1,034	89,66	89,46
		R2	10,0	1059,568	1,060	89,40	
		R3	10,0	1068,357	1,068	89,32	
	C2	R1	88,0	819,396	0,819	99,07	99,07
		R2	88,0	822,638	0,823	99,07	
		R3	88,0	816,521	0,817	99,07	
	C3	R1	100,0	1506,451	1,506	98,49	98,49
		R2	100,0	1512,895	1,513	98,49	
		R3	100,0	1504,197	1,504	98,50	
E2	C1	R1	10,0	214,019	0,214	97,86	97,83
		R2	10,0	217,102	0,217	97,83	
		R3	10,0	220,005	0,220	97,80	
	C2	R1	88,0	432,397	0,432	99,51	99,51
		R2	88,0	428,427	0,428	99,51	
		R3	88,0	427,946	0,428	99,51	
	C3	R1	100,0	431,214	0,431	99,57	99,56
		R2	100,0	435,621	0,436	99,56	
		R3	100,0	441,027	0,441	99,56	
E3	C1	R1	10,0	1381,380	1,381	86,19	86,20
		R2	10,0	1375,601	1,376	86,24	
		R3	10,0	1383,468	1,383	86,17	
	C2	R1	88,0	2454,026	2,454	97,21	97,21
		R2	88,0	2459,531	2,460	97,21	

	C3	R3	88,0	2450,105	2,450	97,22	97,81
		R1	100,0	2184,839	2,185	97,82	
		R2	100,0	2187,325	2,187	97,81	
		R3	100,0	2190,841	2,191	97,81	
E4	C1	R1	10,0	1445,871	1,446	85,54	85,57
		R2	10,0	1441,824	1,442	85,58	
		R3	10,0	1440,369	1,440	85,60	
	C2	R1	88,0	3276,160	3,276	96,28	96,28
		R2	88,0	3273,115	3,273	96,28	
		R3	88,0	3275,495	3,275	96,28	
	C3	R1	100,0	3691,284	3,691	96,31	96,31
		R2	100,0	3697,792	3,698	96,30	
		R3	100,0	3690,652	3,691	96,31	
E5	C1	R1	10,0	3309,923	3,310	66,90	66,91
		R2	10,0	3306,435	3,306	66,94	
		R3	10,0	3311,214	3,311	66,89	
	C2	R1	88,0	2884,196	2,884	96,72	96,72
		R2	88,0	2889,328	2,889	96,72	
		R3	88,0	2890,006	2,890	96,72	
	C3	R1	100,0	3590,921	3,591	96,41	96,41
		R2	100,0	3584,143	3,584	96,42	
		R3	100,0	3587,534	3,588	96,41	
E6	C1	R1	10,0	125,9518	0,126	98,74	98,74
		R2	10,0	129,3610	0,129	98,71	
		R3	10,0	122,629	0,123	98,77	
	C2	R1	88,0	1051,391	1,051	98,81	98,81
		R2	88,0	1053,385	1,053	98,80	
		R3	88,0	1049,972	1,050	98,81	
	C3	R1	100,0	1216,609	1,217	98,78	98,78

		R2	100,0	1222,186	1,222	98,78	
		R3	100,0	1213,735	1,214	98,79	
E7	C1	R1	10,0	1426,737	1,427	85,73	85,74
		R2	10,0	1423,419	1,423	85,77	
		R3	10,0	1427,833	1,428	85,72	
	C2	R1	88,0	2690,429	2,690	96,94	96,94
		R2	88,0	2694,274	2,694	96,94	
		R3	88,0	2697,180	2,697	96,94	
	C3	R1	100,0	1992,983	1,993	98,01	98,00
		R2	100,0	1994,197	1,994	98,01	
		R3	100,0	1998,368	1,998	98,00	
E8	C1	R1	10,0	28,6897	0,029	99,71	99,72
		R2	10,0	25,9262	0,026	99,74	
		R3	10,0	29,7234	0,030	99,70	
	C2	R1	88,0	495,3219	0,495	99,44	99,44
		R2	88,0	499,0053	0,499	99,43	
		R3	88,0	496,842	0,497	99,44	
	C3	R1	100,0	1203,281	1,203	98,80	98,80
		R2	100,0	1200,084	1,200	98,80	
		R3	100,0	1198,769	1,199	98,80	

Realizado por: Medina, Edinson, 2022

Los resultados antes descritos, establecen que todas las cepas bacterianas alcanzaron una degradación de mercurio mayor al 85% en cada una las concentraciones evaluadas; siendo la especie *Hydrogenophaga laconesensis* (E8) la que alcanzó los porcentajes más altos, entre 99,44% y 99,80%. A esta se le suman las especies *Pseudomonas alcaliphila* (E2) y *Micrococcus aloeverae* (E6) que lograron degradar el mercurio en un 98,97% y 98,78%, respectivamente. Recalcando que estas únicas tres especies mantienen un porcentaje de degradación similar en cada concentración, a diferencia de las especies restantes las cuales no superan un 89% de degradación en la concentración inicial (C1), esto se debe a que la densidad celular en esta concentración fue menor frente a las dos concentraciones restantes, por ende, al existir menor cantidad de bacterias, existe también menor degradación del contaminante. A su vez, la baja densidad celular a esta concentración se puede deber a la poca disponibilidad del mercurio en el medio para sus reacciones metabólicas, ya que inicialmente estas bacterias naturalmente se hallaban a una concentración de 88ppm en el suelo. La especie E5, *Staphylococcus saprophyticus*, fue la que alcanzó el menor porcentaje de degradación en su concentración inicial, siendo igual a 66,91%, y para C2 y C3 arrojó valores de 96,72% y 96,41% respectivamente, siendo también uno de los más bajos frente a las especies restantes.

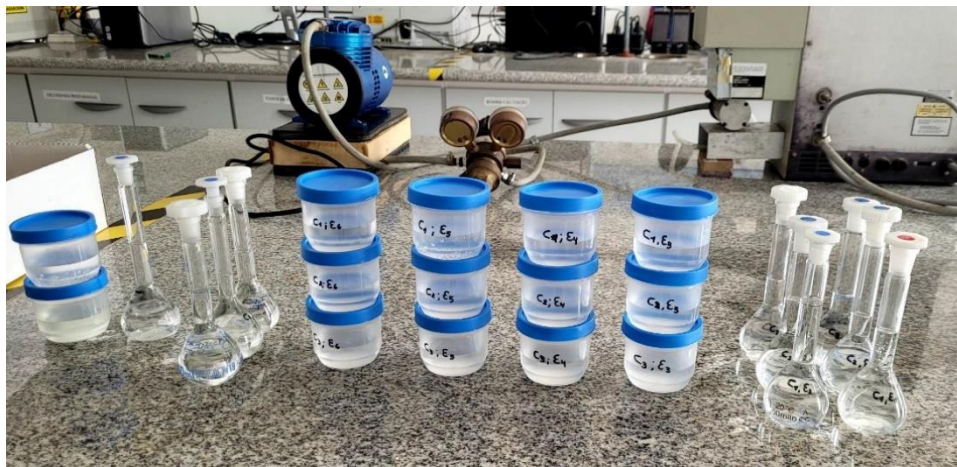


Ilustración 14-3: Caldo nutritivo digerido para análisis de mercurio por espectrofotometría de absorción atómica (24 muestras de la repetición R1).

Realizado por: Medina, Edinson, 2022

Los estudios desarrollados hasta la actualidad en donde se ha determinado el potencial que alcanzan los microorganismos para la degradación de metales pesados, en este caso de mercurio, también han permitido establecer las características que les confieren esta capacidad, que al igual que para el cianuro, son vías enzimáticas que transforman, reducen y/o asimilan el mercurio, donde también se logró identificar a niveles cromosómicos los genes que codifican estas funciones. Chang, et al (2015) establece que la regulación del gen *mer* es mediado por *merR* en

gramnegativas y por *merR2* en grampositivas, que son proteínas reguladoras de la transcripción del operón *mer*, las cuales tienen una gran afinidad para el Hg^{2+} (Chang et al. 2015, pp.7614-7617). El gen *merP* ayuda a codificar la proteína periplasmática, denominada metalchaperona MerP, la cual ayuda a la eliminación del Hg^{2+} y del metilmercurio (CH_3Hg) en el periplasma y con ayuda de proteínas transportadoras, como *MerF*, *MerE*, *MerT* y *MerC*, los transfiere a través de la membrana. Se evidenció que en el Tn501 de *Pseudomonas aeruginosa*, el Hg^{2+} presente en el espacio periplasmático es tomado por los grupos tiol de las cisteínas Cis33 y Cis36 en el *merP* para ser transportado a la reductasa mercúrica citoplasmática *merA* mediante las proteínas de transporte *merT*. Por otro lado, para la transferencia de CH_3Hg es necesaria la respuesta génica del gen *merE* donde intervienen las cisteínas Cis28 y Cis30 y el residuo de histidina His51. De la misma forma sucede con *merF* y *merC* presentes en el Tn21 de *Shigella flexneri* para el transporte de Hg^{2+} (Sone et al. 2017, pp.1996-1998).

Una vez mencionados los genes que codifican las proteínas para el transporte de Hg^{2+} y CH_3Hg , se sabe también que existen otros genes, como el *merA* para la reducción de Hg^{2+} a Hg^0 , en donde sus tres pares de cisteínas muy conservadas funcionan como medio para su reducción (Matsui et al. 2016, pp.4-7). Por otro lado, existe evidencia para la desmetilación del CH_3Hg mediado por el gen *merB* el cual regula la codificación de una liasa organomercurial presente en el citoplasma. La respuesta génica del *merB* son 4 residuos en varias proteínas, de las cuales destacan las cisteínas Cis96, Cis159 y la Asp99 que son clave para la unión a metales y actividad enzimática (Wahba et al. 2016, pp. 20-23).

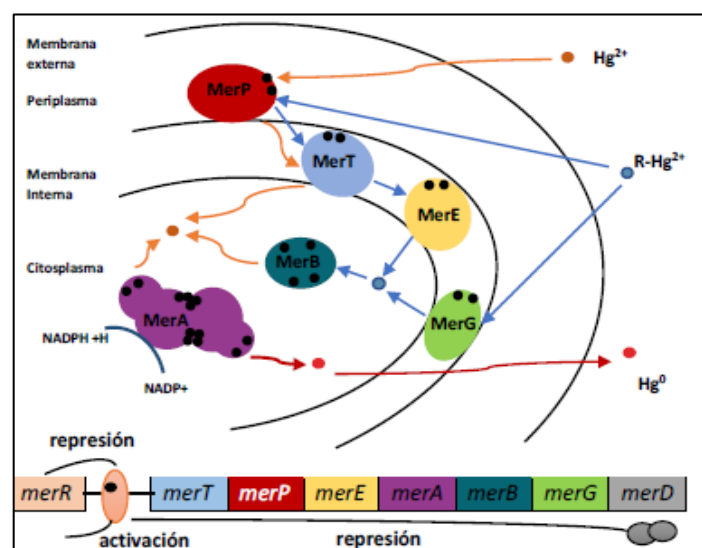


Ilustración 15-3: Genes *mer* que determinan la resistencia al mercurio en bacterias.

Fuente: (Chang et al. 2015)

CONCLUSIONES

Se determinó que el relave minero presenta un pH promedio de 6,136 y una conductividad eléctrica igual 1973,80 $\mu\text{S}/\text{cm}$, siendo un suelo moderadamente ácido característico de suelos mineros debido al drenaje ácido y lixiviación de minerales sulfurosos, donde intervienen también las condiciones de aerobiosis, actividad microbiana y humedad permanente en el relave. Se determinó también que el suelo no presenta contaminación por cianuro ya que su valor se encuentra por debajo del límite permisible (8,0 mg/kg); sin embargo, si existe una contaminación por mercurio catalogada con un grado de perturbación igual a 2 denominado “Perturbación severa” según la norma de suelos, pues se sobrepasa el límite permisible establecido (10,0 mg/kg).

Se aisló un total de 15 cepas bacterianas tras 4 ciclos de aislamiento y purificación, las cuales se caracterizaron macroscópica y microscópicamente, estableciendo su morfología en colonias basados en criterios como color tamaño, forma, borde, elevación, textura y brillo. Así también, tras la selección de 8 cepas, se determinó su morfología individual teniendo principalmente cocos y bacilos; y diferenciación por tinción Gram, de donde se destacan 5 cepas grampositivas y 3 cepas gramnegativas. Finalmente, se establece que 5 cepas presentan al menos un flagelo que les permite moverse, mientras que 3 cepas poseen movilidad nula.

Se identificó la taxonomía de las 8 cepas bacterianas seleccionadas, partiendo por la extracción del ADN y la evaluación de la integridad y calidad de este mediante espectrofotometría de microvolúmenes; la amplificación de los fragmentos 16s y rpoB y su visualización en gel de agarosa. Posteriormente empleando las secuencias de ADN obtenidas por el método de secuenciación Sanger y de alto rendimiento y su ensamblaje mediante herramientas bioinformáticas, se identificó las cepas bacterianas por porcentaje de similitud en el programa Blast® del NCBI. Es así como la cepa E1 corresponde a la especie *Pseudomonas chengduensis*, E2 a *Pseudomonas alcaliphila*; E3 y E7 a *Bacillus subtilis*; E4 a *Bacillus altitudinis*; E5 a *Staphylococcus saprophyticus*; E6 a *Micrococcus aloeverae*; y E8 a *Hydrogenophaga laconesensis*.

Se evaluó a escala de laboratorio el potencial degradador de las cepas bacterianas identificadas, donde para el medio cianurado se alcanzó un porcentaje de degradación entre 7,94% y 66,24%; por tanto, se rechaza la hipótesis alternativa y se acepta la hipótesis nula: “H₀1, Las bacterias aisladas y caracterizadas de los relaves mineros del sector San Carlos de las Minas son capaces de degradar menos del 70% del cianuro en pruebas a escala de laboratorio.” Por otro lado, en el medio con mercurio, las cepas bacterianas alcanzaron un porcentaje de degradación mayor al 85%

en la concentración C1 y porcentajes entre el 96,31% y 98,80% en las concentraciones restantes; aceptando la hipótesis alternativa “Ha2: Las bacterias aisladas y caracterizadas de los relaves mineros del sector San Carlos de las Minas son capaces de degradar al menos 70% del mercurio en pruebas a escala de laboratorio.”

RECOMENDACIONES

Se recomienda evaluar el comportamiento entre especies para determinar si pueden ser empleados dentro de un mismo consorcio bacteriano para procesos de biorremediación.

Se sugiere determinar la concentración óptima de inóculo para las pruebas de degradación.

Se propone ampliar el estudio con la caracterización de todas las cepas aisladas ya que también pueden ser de interés biotecnológico.

Se recomienda determinar la concentración máxima de contaminantes a la que aún se registre crecimiento microbiano.

BIBLIOGRAFÍA

ALAIN, M. *Técnicas de Sembrado Microbiológico*. [blog]. México: Blogspot, 2012. [Consulta: 15 de enero de 2022]. Disponible en: http://projectomartin.blogspot.com/2012/12/practica-7_9.html.

ASMANI, K.-L. et al. "Identification and characterization of *Bacillus altitudinis* strain KA15 newly isolated from the highest summit of the Djurdjura Mountains in Kabylia, Algeria". *MOL2NET, International Conference Series on Multidisciplinary Sciences* [en línea], 2020, (Algeria), vol. 6, pp. 1-6. [Consulta: 10 de enero de 2023]. Disponible en: <http://sciforum.net/conference/mol2net-06>.

ASTM Designation D 4220 - 00. Estándar Practices for Preserving and Transporting Soil Samples. Disponible en: <http://ingenieriasalva.blogspot.com/2009/04/astm-designacion-d-4220-00.html>.

AUSTIN, C. *Bioinformática*. [blog]. United States of America: National Human Genome Research Institute, 2019. [Consulta: 17 de marzo de 2022]. Disponible en: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Bioinformatica>.

BANCO CENTRAL DEL ECUADOR. "Cartilla Informativa: Sector minería". Banco Central del Ecuador, vol 1 (1), (2016), (Ecuador) pp. 1-4.

BANCO CENTRAL DEL ECUADOR. "Reporte de minería _ Primer Trimestre." [blog], Ecuador: Contenido.BCE, 2021. [Consulta: 20 de enero de 2022]. Disponible en: <https://contenido.bce.fin.ec/documentos/Estadisticas/Hidrocarburos/ReporteMinero072021.pdf>.

CAÑEDO, R. & ARENCIBIA, R. "Bioinformática: En busca de los secretos moleculares de la vida". *Acimed*, vol. 12 (6), (2004), (Cuba) pp. 1-30. ISSN 10249435.

CARRASCO, M.V. & LEÓN, L.T. "Minería en el Ecuador: sostenibilidad y licitud". *Revista Estudios del Desarrollo Social: Cuba y América Latina* [en línea], 2018, (Ecuador), vol. 6 (2), pp. 83-103. [Consulta: 25 de marzo de 2022]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2308-01322018000200006&lng=es&nrm=iso%3E. ISSN 2308-0132.

CHANG, C.C. et al. "Structural basis of the mercury(II)-mediated conformational switching of the dual-function transcriptional regulator MerR". *Nucleic Acids Research*, [en línea], 2015, (Taiwán) vol. 43 (15), pp. 7612-7623. [Consulta: 18 de enero de 2023]. ISSN 13624962. DOI 10.1093/nar/gkv681.

CLARK, B. & BELLAMY, J. Imperialismo ecológico y la fractura metabólica global. *Theomai* 26, vol. 50. (2012), (United States of America) pp. 45-69.

CORNEJO, M. "Biorremediación de relaves mineros con un consorcio microbiano nativo caracterizado molecularmente y productor de enzimas degradadoras de cianuro y derivados". *Programa De Difusión Tributaria Y Su Incidencia En La Cultura Tributaria De Los Comerciantes Del Mercado Modelo De Tumbes* [en línea], 2016, (Perú) pp. 1-6. [Consulta: 10 de abril de 2022]. ISSN 09205861. Disponible en: http://repositorio.concytec.gob.pe/bitstream/20.500.12390/153/3/2016_Cornejo_Biorremediacion-relaves-mineros.pdf.

DAGLIO, G. et al. "Almacenamiento de muestras de suelo: incidencia sobre la cuantificación de biomasa microbiana". *Agriscientia*, vol. 22 (2), (2005), (Argentina) pp. 63-68. ISSN 1668-298x.

DINIS, M. de L. et al. "Characterization of a mine legacy site: an approach for environmental management and metals recovery". *Environmental Science and Pollution Research*, [en línea], 2020, (Portugal) vol. 27 (9), pp. 10103-10114. [Consulta: 23 de diciembre de 2022]. ISSN 16147499. DOI 10.1007/s11356-019-06987-x.

DUQUE, A. et al. "Evaluación de la transformación del arsénico con cepas bacterianas aisladas de relaves mineros, en el cantón Ponce Enríquez - Ecuador". *Perfiles*, vol. 2, 2016, (Ecuador) pp. 14-19.

ENRRIQUEZ, I. Comunicación Para El Desarrollo a Través De La Radio, Una Estrategia Para La Minería Sustentable En Zamora Chinchipe (Trabajo de Titulación) [en línea]. Universidad de Cuenca. Facultad de Filosofía, Letras y Ciencias de la Educación. Escuela de Comunicación Social. (Cuenca - Ecuador). 2010 vol. 1, pp. 123. [Consulta: 18 de febrero de 2022]. Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/1794/1/tc263.pdf>.

ENVIRONMENTAL LAW INSTITUTE. "Prevención de la Contaminación Minera: Propuesta de un Marco Común para las Américas". *ELI*. [en línea]. 2000, (United States of America) vol. 1, pp. 1-16. [Consulta: 18 de febrero de 2022]. Disponible en: https://www.eli.org/sites/default/files/eli-pubs/d10_02s.pdf.

EPA Method 9013A: Cyanide extraction procedure for soil and oils. *Environmental Protection Agency*, 2014.

FAKRUDDIN, M. et al. "Identification and characterization of microorganisms: DNA-fingerprinting methods". *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, vol. 35 (4), (2013), (Bangladesh) pp. 397-404. ISSN 01253395.

ISO 11465: Soil quality. Determination of dry matter and water content on a mass basis – Gravimetric method. *International Organization for Standardization*, 1993.

KI, J.-S. et al. "Discovery of marine Bacillus species by 16S rRNA and rpoB comparisons and their usefulness for species identification". *Journal of Microbiological Methods* [en línea], 2009, (China) vol. 77 (1), pp. 48-57. [Consulta: 15 de enero de 2023]. ISSN 01677012. DOI 10.1016/j.mimet.2009.01.003. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2009.01.003>.

KISCHINEVZKY, C. & RODARTE, B. *Manual de biotecnología*. ed. 1°. Ciudad de México - México: Facultad de Ciencias UNAM, 2011. pp. 1-98.

LARENAS, D. et al. "Minería a Gran Escala: Una Nueva Industria para Ecuador". *Polémika* [en línea], 2017, (Ecuador) vol. 1 (12), pp. 67-91. [Consulta: 20 de marzo de 2022]. ISSN 2528-7796. Disponible en: <https://www.usfq.edu.ec/publicaciones/polemika/Paginas/revistas/polemika012.aspx>.

LILLO, J. "Actividades antropogénicas: Impactos sobre medio ambiente". *Grupo de estudios en minería y medioambiente* [en línea], 2012, (España) pp. 1-35. [Consulta: 18 de febrero de 2022]. Disponible en: [https://www.ucm.es/data/cont/media/www/pag-15564/Impactos de la minería - Javier Lillo.pdf](https://www.ucm.es/data/cont/media/www/pag-15564/Impactos%20de%20la%20miner%C3%ADa%20-%20Javier%20Lillo.pdf).

LIM, S. Microbiología General Trabajo Práctico N° 2 Identificación De De Microorganismos. 2020, pp. 1-28.

LIMINGUI, C.P. et al. "Bacterial Community Diversity of a Congolese Traditional Fermented Food, "Pandé", Revealed by Illumina Miseq™ Sequencing of 16S rRNA Gene". *Open Journal of Applied Sciences* [en línea], 2022, (Congo) vol. 12 (3), pp. 387-405. [Consulta: 20 de enero de 2022]. ISSN 2165-3917. DOI 10.4236/ojapps.2022.123027.

LUQUE-ALMAGRO, V.M. et al. "Exploring anaerobic environments for cyanide and cyano-derivatives microbial degradation". *Applied Microbiology and Biotechnology* [en línea], 2018, (España) vol. 102 (3), pp. 1067-1074. [Consulta: 20 de enero de 2022]. ISSN 14320614. DOI 10.1007/s00253-017-8678-6.

MALBRÁN, C. "Método de Determinación de Sencibilidad Antimicrobiana por Dilución - MIC Testing". *Clinical and Laboratory Standards Institute*, vol. 32 (2), (2012), (United States of America) pp. 1-48.

MANTRI, S. et al. "Description of *Hydrogenophaga laconesensis* sp. nov. isolated from tube well water". *Archives of Microbiology*, [en línea], 2016, (India) vol. 198 (7), pp. 637-644. [Consulta: 20 de enero de 2023]. ISSN 1432072X. DOI 10.1007/s00203-016-1224-6.

MATSUI, K. et al. "Mercury resistance transposons in Bacilli strains from different geographical regions". *FEMS Microbiology Letters*, [en línea], 2016, (Japón) vol. 363 (5), pp. 1-8. [Consulta: 20 de enero de 2023]. ISSN 15746968. DOI 10.1093/femsle/fnw013.

MAU, S. et al. "Aislamiento de bacterias del suelo y su potencial utilización en sistemas de tratamiento de aguas residuales". *Revista de Ciencias Ambientales*, [en línea], 2011, (Costa Rica) vol. 42 (2), pp. 45-52. [Consulta: 16 de abril de 2022]. ISSN 1409-2158. DOI 10.15359/rca.42-2.4.

MENÉNDEZ, E. & RIVAS, R. "Introducción al uso de herramientas bioinformáticas para el análisis de secuencias de ADN". *Departamento de Microbiología y genética. Universidad de Salamanca*, vol. 1 (2014), (España) pp. 1-8.

EPA Method 9045D. Soil and Waste pH. *Environmental Protection Agency*, 2004. ISSN 18783503.

EPA Method 9050A: Specific Conductance. *Environmental Protection Agency*, 1996. ISSN 17549469.

DECRETO SUPREMO N° 002-2013-MINAM. Guía para muestreo de suelos. *Ministerio del Ambiente*. Ecuador: Disponible en: http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2014/04/GUIA-MUESTREO-SUELO_MINAM1.pdf.

MOREANO, F. et al. Capítulo 7-Minería , Minerales y Desarrollo Sustentable en Ecuador. 2014, (Ecuador) pp. 1-96.

OVIEDO, R. et al. "Contamination by heavy metals in the south of Ecuador associated to the mining activity". *Revista Bionatura*, [en línea], 2017, (Ecuador) vol. 2 (4), pp. 437-441. [Consulta: 10 de abril de 2022]. ISSN 13909355. DOI 10.21931/RB/2017.02.04.5.

PANIAGUA, G. et al. "Resistencia a antibióticos y metales pesados en cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*". *Revista Médica del Hospital General de México*, [en línea], 2003, (México) vol. 66 (1), pp. 13-21. [Consulta: 15 de marzo de 2022]. ISSN 0185-1063.

PARK, J.M. "Cyanide bioremediation: the potential of engineered nitrilases". *Applied Microbiology and Biotechnology* [en línea], 2017, (United States of America - South Africa) vol. 101 (8), pp. 3029-3042. [Consulta: 22 de enero de 2023]. ISSN 14320614. DOI 10.1007/s00253-017-8204-x.

PEÑA, E. & MENÉNDEZ, J. "Environmental study of gold mining tailings in the Ponce Enriquez mining area (Ecuador)". *DYNA* [en línea], 2016, (Colombia) vol. 83 (195), pp. 237-245. [Consulta: 06 de diciembre de 2022]. ISSN 00127353. DOI 10.15446/dyna.v83n195.51745.

PRAKASH, O. et al. "Description of *Micrococcus aloeverae* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from *Aloe vera*". *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, [en línea], 2014, (India) vol. 64, pp. 3427-3433. [Consulta: 15 de enero de 2023]. ISSN 14665034. DOI 10.1099/ijs.0.063339-0.

PUICON, Y. & HURTADO, J. "Bioremediation of soils polluted with mercury by using *Pseudomonas* sp isolated from informal mining zones". *Laboratorio de Biotecnología Ambiental de la Universidad Peruana Cayetano Heredia*, vol.1 2013, (Perú) pp. 1-7.

RAZ, R. et al. "Who are you - *Staphylococcus saprophyticus*?" *Clinical Infectious Diseases*, [en línea], 2005, (United States of America) vol. 40 (6), pp. 896-898. [Consulta: 15 de enero de 2023]. ISSN 10584838. DOI 10.1086/428353.

RODRÍGUEZ, R. & PAREDES, M. *Identificación de un consorcio microbiano proveniente de relaves mineros que permita la generación de electricidad en una CCM.* (Trabajo de Titulación) Universidad Católica de Santa María, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica. Arequipa - Perú, 2019. pp. 20-25.

SCRAGG, A. "MICROBIANO". *Revista Digital Dokumen*, vol. 2 (3), (2018), (United Kindom) pp. 1-111.

SONE, Y. et al. "Cysteine and histidine residues are involved in Escherichia coli Tn21 MerE methylmercury transport". *FEBS Open Bio* [en línea], 2017, (Japón) vol. 7 (12), pp. 1994-1999. [Consulta: 22 de enero de 2023]. ISSN 22115463. DOI 10.1002/2211-5463.12341.

SOSA, A.G. et al. "Desplazamiento de la práctica de diluciones entre la comunidad de ingenieros bioquímicos y la escuela". *Acta Latinoamericana de Matemática Educativa* [en línea], 2014, (México - Chile) pp. 961-970. [Consulta: 10 de febrero de 2022]. Disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/U4b_MedicionCrecimiento_19837.pdf.

THIEMAN, W. & PALLADINO, M. *Introducción a la Biotecnología.* 2º edición. Madrid España. Pearson Education, 2010. pp. 209-215.

TOVAR, F. *Técnicas y Métodos de Aislamiento y Selección de Microorganismos.* [blog]. México: Conalepfeliztovar, 26 de septiembre, 2012. [Consulta: 20 de enero de 2022]. Disponible en: <https://conalepfelixtovar.wordpress.com/2012/09/26/tecnicas-y-metodos-de-aislamiento-y-seleccion-de-microorganismos/>.

UCHUARI, H. Estudio geológico estructural y determinación de la calidad del macizo rocoso de la galería de exploración T1 en el área minera Cambanas (código 246) ubicado en la parroquia San Carlos de las Minas, cantón Zamora, provincia de Zamora Chinchipe (Trabajo de Titulación) [en línea]. Universidad Nacional de Loja, Facultad de la Energía, Las Industrias y Los Recursos Naturales No Renovables, Escuela Ingeniería en Geología Ambiental y Ordenamiento Territorial. 2020. pp. 40-47. [Consulta: 22 de diciembre de 2022]. Disponible en: <http://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/23232>.

UNDA, N. Aislamiento e identificación de bacterias nativas biodegradadoras de cianuro y arsénico presente en relaves mineros de oro (Trabajo de Titulación) [en línea]. Universidad Central de Ecuador, Facultad de Ingeniería en Geología, Minas, Petróleo y Ambiental, Escuela de Ingeniería Ambiental. 2020. pp. 17-20. [Consulta: 16 de abril de 2022]. Disponible en: <http://www.akrabjuara.com/index.php/akrabjuara/article/view/919>.

VAN DIJL, J.M. & HECKER, M. "Bacillus subtilis: From soil bacterium to super-secreting cell factory". *Microbial Cell Factories* [en línea], 2013, (Netherlands) vol. 12 (1), pp. 1-6. [Consulta: 22 de enero de 2023]. ISSN 14752859. DOI 10.1186/1475-2859-12-3.

VÁZQUEZ, L.S. et al. "Minería a gran escala en Ecuador: Conflicto, resistencia y etnicidad". *AIBR Revista de Antropología Iberoamericana*, [en línea], 2017, (España - Noruega - Ecuador) vol. 12 (2), pp. 169-192. [Consulta: 15 de febrero de 2022]. ISSN 15789705. DOI 10.11156/aibr.120205.

VERA, S. et al. "Uso De Herramientas Bioinformáticas En La Evaluación De Secuencias «Dna Barcode» Para La Identificación a Nivel De Especie". *Universidad Militar Nueva Granada* [en línea], 2012, (España) vol. 8 (2), pp. 196-209. [Consulta: 15 de enero de 2023]. ISSN 1900-4699.

VERMA, M. et al. "Genome Sequencing". *Sequences Analysis and Evolution, Methods in Molecular Biology* [en línea], 2017, (United States of America), vol. 15(25). [Consulta: 05 de diciembre de 2022]. DOI 10.1007/978-1-4939-6622-6_1.

WAHBA, H.M. et al. "Structural and Biochemical Characterization of a Copper-Binding Mutant of the Organomercurial Lyase MerB: Insight into the Key Role of the Active Site Aspartic Acid in Hg-Carbon Bond Cleavage and Metal Binding Specificity". *Biochemistry* [en línea], 2016, (United States of America) vol. 55 (7), pp. 1070-1081. [Consulta: 22 de enero de 2023]. ISSN 15204995. DOI 10.1021/acs.biochem.5b01298.

WEIL, R.R. & BRADY, N.C. *The Nature and Properties of Soils*. 15th edición. Maryland, United States of America: Pearson Education, 2017. ISBN 978-0133254488. pp. 256-262.

YOUNG, K.D. "Bacterial morphology: why have different shapes?" *Current Opinion in Microbiology*, [en línea], 2007, (United States of America) vol. 10 (6), pp. 596-600. [Consulta: 10 de noviembre de 2022]. ISSN 13695274. DOI 10.1016/j.mib.2007.09.009.

YUMOTO, I. et al. "Pseudomonas alcaliphila sp. nov., a novel facultatively psychrophilic alkaliphile isolated from seawater". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, [en línea], 2001, (Japón) vol. 51(2), pp. 349-355. [Consulta: 15 de enero de 2023]. ISSN 14665026. DOI 10.1099/00207713-51-2-349.

ZOUAGUI, H. et al. "Draft Genome Sequences of Three Pseudomonas chengduensis Strains Isolated from Desert Soil in Morocco". *American Society For Microbiology*, [en línea], 2022, (Morocco) vol. 6 (6), pp. 8-10. [Consulta: 15 de enero de 2023]. DOI 10-1128/mra.01082-22.



ANEXOS

ANEXO A: INFORME DE LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS BACTERIANAS



Av. De los Granados E14-285 y Eloy Alfaro
Teléfono: 0998982450
e-mail: ideen.ecuador@email.com
R.U.C. 1713443479001

Informe de Resultados

Nombre del Proyecto: Identificación molecular de microorganismos – Edison Medina

Informe No.: A-354

Técnico Responsable: Camila Gallegos, Ing.

Fecha: 16/01/2023

Resultados

Código IDgen	Muestra	Longitud	Calidad	Organismo	Fragmento	% de identidad	Nº Acesión
B501	E1;1	1459	---	<i>Pseudomonas chengduensis</i>	16S	100	NR_125523.1
B502	E2;1	168	89.8	<i>Pseudomonas alcaliphila</i>	16S	98.80	NR_114072.1
B503	E3;2	1035	99.8	<i>Bacillus subtilis</i>	rpoB	100	CP053102.1
B504	E4;3	147	94.6	<i>Bacillus altitudinis</i>	16S	99.32	MT569984.1
B505	E5;2	762	100	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	16S	100	CP035294.1
B506	E6;1	768	99.7	<i>Micrococcus aloeverae</i>	16S	100	NR_134088.1
B507	E7;1	683	99.9	<i>Bacillus subtilis</i>	16S	99.71	OP986262.1
B508	E8;1	749	99.7	<i>Hydrogenophaga laconesensis</i>	16S	99.6	NR_149183.1

Firma autorizada

Francisco Javier Flores Flor, PhD.

Propietario IDgen



epoch

Dirección de Bibliotecas y
Recursos del Aprendizaje

UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y
DOCUMENTAL

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 23 / 03 / 2023

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: Edinson Marcelo Medina Barrera
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Ciencias
Carrera: Ingeniería en Biotecnología Ambiental
Título a optar: Ingeniero en Biotecnología Ambiental
f. Analista de Biblioteca responsable: Ing. Rafael Inty Salto Hidalgo

0454-DBRA-UPT-2023