



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD



**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE
BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA**

TESIS

**BIOADSORCIÓN DE METALES POR BACTERIAS AISLADAS DE
SEDIMENTOS DE DRENAJES ÁCIDOS DE UN TÚNEL MINERO
LOCALIZADO EN EL DISTRITO DE HUALGAYOC, CAJAMARCA 2023**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**

PRESENTADO POR:

BACHILLER: KATHERIN FIORELA PAREDES RUIZ

ASESOR:

Mblg: LUIS FELIPE VALDEZ NUÑEZ

CAJAMARCA – PERÚ

2025

CONSTANCIA DE INFORME DE ORIGINALIDAD

1. Investigador: **Katherin Fiorela Paredes Ruiz**
DNI: **72486207**
Escuela Profesional/Unidad UNC: **ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA Y BIOTECNOLOGÍA**
2. Asesor:
M.Cs. Mblgo. LUIS FELIPE VALDEZ NÚÑEZ
Facultad/Unidad UNC: **FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**
3. Grado académico o título profesional al que accede:
☐ Bachiller ☒ Título profesional ☐ Segunda especialidad
☐ Maestro ☐ Doctor
4. Tipo de Investigación:
☒ Tesis ☐ Trabajo de investigación ☐ Trabajo de suficiencia profesional
☐ Trabajo académico
5. Título de Trabajo de Investigación:
BIOADSORCIÓN DE METALES POR BACTERIAS AISLADAS DE SEDIMENTOS DE DRENAJES ÁCIDOS DE UN TÚNEL MINERO LOCALIZADO EN EL DISTRITO DE HUALGAYOC, CAJAMARCA 2023
6. Fecha de evaluación del antiplagio: **12/5/2025**
7. Software antiplagio: ☒ **TURNITIN** ☐ **URKUND (OURIGINAL) (*)**
8. Porcentaje de Informe de Similitud: **13%**
9. Código Documento: **oid:3117:458996006**
10. Resultado de la Evaluación de Similitud:
☒ **APROBADO** ☐ **PARA LEVANTAMIENTO DE OBSERVACIONES O DESAPROBADO**

Cajamarca, 14 de mayo del 2025



* En caso se realizó la evaluación hasta setiembre de 2023

Copyright©

Katherin Fiorela Paredes Ruiz

Todos los derechos reservados

FICHA CATALOGRÁFICA

Paredes Ruiz, K. 2025. **Bioadsorción de metales por bacterias aisladas de sedimentos de drenajes ácidos de un túnel minero localizado en el distrito de Hualgayoc, Cajamarca 2023**/ Katherin Fiorela Paredes Ruiz.

Escuela Académico Profesional de Biología y Biotecnología

Asesor: Mblgo. Luis Felipe Valdez Nuñez

Disertación Académica para optar el Título Profesional de Biólogo Biotecnólogo UNC
– 2025.

**Bioadsorción de metales por bacterias aisladas de sedimentos de drenajes ácidos
de un túnel minero localizado en el distrito de Hualgayoc, Cajamarca 2023**

AUTORA: Katherin Fiorela Paredes Ruiz

ASESOR: Mblgo. Luis Felipe Valdez Nuñez

Tesis evaluada y aprobada para la obtención del Título Profesional de Biólogo
Biotecnólogo de la Universidad Nacional de Cajamarca, por los siguientes jurados.

JURADO EVALUADOR



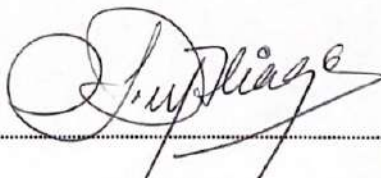
Presidente

Dr. Luis Alberto Azabache Coronado



Secretaria

Dra. Consuelo Belania Plasencia Alvarado



Vocal

M.Cs. Arturo Ulises Díaz Aliaga



Universidad Nacional de Cajamarca

"Norte de la Universidad Peruana"

Fundada por Ley 14015 del 13 de Febrero de 1962

Facultad de Ciencias de la Salud

Av. Atahualpa 1050

Teléfono/ Fax 36-5845



MODALIDAD "A"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO

En Cajamarca, siendo las 11 am del 08 de Mayo del 2025, los integrantes del Jurado Evaluador para la revisión y sustentación de la tesis, designados en Consejo de Facultad a propuesta del Departamento Académico, reunidos en el ambiente 15-103 de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Cajamarca, dan inicio a la sustentación de tesis denominada:

Bioadsorción de metales por bacterias aisladas de sedimentos de drenajes de un túnel minero localizado en el distrito de Itealpaya, Cajamarca 2023.

del (a) Bachiller en Ciencias Biológicas:

Katherin Fiorda Paredes Ruiz

Siendo las 12:12 pm del mismo día, se da por finalizado el proceso de evaluación, el Jurado Evaluador da su veredicto en los siguientes términos: excelente, con el calificativo de: 19, con lo cual el (la) Bachiller en Ciencias Biológicas se encuentra apta para la obtención del Título Profesional de: **BIÓLOGO BIOTECNÓLOGO**.

Miembros Jurado Evaluador Nombres y Apellidos		Firma
Presidente:	<u>Dr. Luis Alberto Azasache Coronado</u>	
Secretario(a):	<u>Dra. Consuelo Belania Floresca Alvarado</u>	
Vocal:	<u>MCS. Arturo Ulises Díaz Alcega</u>	
Accesitaria:		
Asesor (a):	<u>MCS. Luis Felipe Valdez Méñez</u>	
Asesor (a):		

Términos de Calificación:

EXCELENTE (19-20)

MUY BUENO (17-18)

BUENO (14-16)

REGULAR (12-13)

REGULAR BAJO (11)

DESAPROBADO (10 a menos)

AGRADECIMIENTO

A Dios por sus innumerables bendiciones que iluminan mi vida cada día y permitir acabar un logro más en mi vida profesional. Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mis queridos padres y hermanos, por ser la fuente inagotable de amor, apoyo y motivación en cada paso de este camino. Gracias por su amor incondicional y sacrificios, y por brindarme las herramientas necesarias para lograr mis metas, ustedes son mi motor para seguir adelante. A mis queridos amigos, con quienes tuve el privilegio de contar con su compañía y apoyo incondicional en todo el proceso de la ejecución de este trabajo.

Así mismo, deseo extender mi más sincera gratitud a mi asesor, el Mblgo. Luis Felipe Valdez Nuñez, por su orientación, paciencia y dedicación a lo largo de este proceso. Su experiencia no solo enriquecieron este trabajo, sino que también fomentaron mi crecimiento personal y académico. De igual manera, extendiendo mi gratitud al M. Cs. Cristian Hobán por permitirme hacer uso de los equipos del laboratorio de Inmunología e Investigación de Ciencias Veterinarias.

TABLA DE CONTENIDO	Pág.
TÍTULO.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT	xiii
CAPÍTULO I.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II.....	3
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes de la Investigación	3
2.2. Bases Teóricas	6
2.2.1. Bacterias acidófilas en ambientes mineros.....	6
2.2.2. Bacterias y bioadsorción de metales	9
2.2.2.1. Diferencia entre bioadsorción y bioacumulación	10
2.2.2.2. Interacción de la pared celular en la adsorción de metales	12
2.2.2.3. Mecanismos de la bioadsorción	12
2.2.3. Metales en los drenajes ácidos de mina (DAM).....	14
2.2.4. Acumulación de manganeso, zinc y calcio en el ambiente	19
CAPÍTULO III	21
3. DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS.....	21
3.1. Nivel de investigación	21
3.2. Tipo y diseño de estudio.....	21
3.2.1. Tipo de investigación	21
3.2.2. Diseño de investigación.....	21
3.3. Material biológico	21
3.4. Descripción del sitio de muestreo y análisis fisicoquímicas	21
3.5. Aislamiento y caracterización microbiológica de los aislados bacterianos....	23
3.5.1. Enriquecimiento y aislamiento bacteriano	23
3.5.2. Caracterización microbiológica de los aislamientos	24
3.6. Ensayo de tolerancia a metales y formación del consorcio bacteriano	25
3.6.1. Ensayo de tolerancia a metales.....	25
3.6.2. Formación del consorcio bacteriano.....	26
3.7. Ensayo de bioadsorción de metales.....	27
3.7.1. Diseño del experimento.....	27
3.7.2. Análisis de metales disueltos.....	27

3.2. Procesamiento y análisis de datos	28
CAPÍTULO IV	29
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
4.1. Resultados	29
4.1.1. Características fisicoquímicas de las muestras.....	29
4.1.2. Aislamiento y caracterización microbiológica de los aislamientos bacterianos.....	29
4.1.3. Ensayo de tolerancia a metales.....	31
4.1.3.1. Formación del consorcio bacteriano.....	33
4.1.4. Ensayo de bioadsorción.....	34
4.1.5. Análisis estadísticos	35
4.2. Discusión.....	36
4.2.1. Parámetros fisicoquímicos de los puntos de muestreo.....	36
4.2.2. Características microbiológicas de los aislamientos bacterianos	37
4.2.3. Tolerancia a metales de los aislamientos bacterianos	39
4.2.4. Bioadsorción de metales por el consorcio bacteriano	41
CAPÍTULO V	44
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	44
5.1. Conclusiones	44
5.2. Recomendaciones.....	45
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
APÉNDICES	54
ANEXOS.....	66

Lista de abreviaciones

CDX: Czapeck-Dox

ECA: Estándares de Calidad Ambiental

LB: Luria Bertani

LMP: Límites Máximos Permisibles

ORP: Potencial de Óxido Reducción

Glosario

Acidófilos: microorganismos que son capaces de crecer o prosperar en ambientes cuyo pH es ácidos (1-5), se pueden clasificar como acidófilos extremos cuyo crecimiento óptimo es a $\text{pH} < 3$ y acidófilos moderados con un pH óptimo entre 3-5 (Barrie Johnson y Aguilera, 2019).

Bioadsorción: Proceso que utiliza un material biológico como bacterias, hongos, levaduras, residuos orgánicos, etc., que adhieren y retienen a iones o moléculas sobre la superficie del material biológico. Es un proceso mucho más rápido e involucra múltiples mecanismo como adsorción, intercambio iónico, complejación, etc (Fomina y Gadd, 2014).

Bioacumulación: Proceso activo realizado por microorganismos vivos que absorben elementos en el interior de la célula y son dependientes del metabolismo, involucra algunas estructuras internas de la célula, características genéticas y procesos enzimáticos (Pham *et al.*, 2022).

Drenajes ácidos de mina: Efluentes que son generados por los residuos mineros y se caracterizan por tener pH ácido (< 5), concentraciones elevadas de metales pesados y sulfuros afectando la calidad de agua (Chaparro, 2015).

Sideróforos: Moléculas producidas por microorganismos como bacterias y hongos que presentan una elevada afinidad hacia el metal Fe para la captación del mismo (Hesse *et al.*, 2018).

**Bioadsorción de metales por bacterias aisladas de sedimentos de drenajes ácidos
de un túnel minero localizado en el distrito de Hualgayoc, Cajamarca 2023**

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar la bioadsorción de metales por bacterias aisladas de sedimentos de un túnel minero del distrito de Hualgayoc, Cajamarca 2023. Los aislamientos bacterianos se obtuvieron a partir de sedimentos ácidos (pH 4) de un túnel minero y se utilizaron tres medios de cultivo: R2A, Czapeck Dox y Luria Bertani. Los aislamientos fueron caracterizados fenotípicamente (morfología de colonias) y microscópicamente (tinción Gram y de esporas). Así también, se evaluó la producción de sideróforos de los aislamientos utilizando el ensayo cromo azurol sulfonato (overlaid CAS). Se realizó un ensayo de tolerancia de los aislamientos a Ca (33,3 mg/L; 66,6 mg/L; 99,9 mg/L), Mn (57,3 mg/L; 114,7 mg/L; 1721,1 mg/L) y Zn (86,4 mg/L; 172,9 mg/L; 259,4 mg/L) y se formó un consorcio bacteriano con los aislamientos más tolerantes (A1P, 2A, A3.2). Después se evaluó la capacidad de bioadsorción de dicho consorcio frente a la máxima concentración tolerada de cada metal por 30 días a 30°C. En el experimento se obtuvo 8 aislamientos bacterianos (acidófilos moderados) de morfología bacilar, 6 Gram positivos (A3.2, L1, LH, C2, C3.3, C4) y 2 Gram negativos (A1P, 2A). El aislamiento C3.3 fue el único que produjo sideróforos de acuerdo con la metodología empleada. Luego del ensayo de tolerancia, los aislamientos A3.2, A1P y 2A mostraron la capacidad de tolerar la máxima concentración de los 3 metales estudiados conformando así el consorcio bacteriano. Al final, el consorcio tuvo la capacidad de remover hasta 16,86 %; 69,68 % y 99,99 % de Ca, Zn y Mn, respectivamente, durante los 30 días del experimento del ensayo de bioadsorción.

Palabras claves: Bacterias, acidófilos, metales, sideróforos, bioadsorción.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the bioadsorption of metals by bacteria isolated from sediments of a mining tunnel in the district of Hualgayoc, Cajamarca 2023. Bacterial isolates were obtained from acidic sediments (pH 4) from a mining tunnel and three culture media were used: R2A, Czapeck Dox and Luria Bertani. The isolates were characterized phenotypically (colony morphology) and microscopically (Gram and spore staining). The siderophore production of the isolates was also evaluated using the chromium azurol sulfonate assay (CAS overlaid). A tolerance test of the isolates to Ca (33,3 mg/L; 66,6 mg/L; 99,9 mg/L), Mn (57,3 mg/L; 114,7 mg/L; 1721,12 mg/L) and Zn (86,4 mg/L; 172,9 mg/L; 259,4 mg/L) was performed and a bacterial consortium was formed with the most tolerant isolates (A1P, 2A, A3.2). The bioadsorption capacity of this consortium was then evaluated against the maximum tolerated concentration of each metal for 30 days at 30°C. The experiment yielded 8 bacterial isolates (moderate acidophilic) of bacillary morphology, 6 Gram positive (A3.2, L1, LH, C2, C3.3, C4) and 2 Gram negative (A1P, 2A). Isolate C3.3 was the only one that produced siderophores according to the methodology employed. After the tolerance test, isolates A3.2, A1P and 2A showed the ability to tolerate the maximum concentration of the 3 metals studied, thus forming the bacterial consortium. In the end, the consortium had the capacity to remove up to 16,86 %; 69,68 % and 99,99 % of Ca, Zn and Mn, respectively, during the 30 days of the bioadsorption test experiment.

Key words: Acidophilic bacteria, metal, siderophores, bioadsorption.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Los metal(oid)es (Cd, Al, Co, Fe, Mn, As, Zn) son elementos inorgánicos que suelen disponerse en el ambiente por la acción de diferentes actividades antropogénicas, como por ejemplo, la actividad minera (Covarrubias y Peña, 2017; Castillo *et al.*, 2021). Una vez que los metales entran en contacto con el ambiente, estos pueden alterar diferentes ecosistemas tales como recursos hídricos y suelos de cultivo debido a su rápida movilización y acumulación (Bautista, 2008), lo que representa un riesgo constante para la salud humana (Covarrubias y Peña, 2017; Castillo *et al.*, 2021). A pesar de esto, la mitigación total de este problema está lejos de ser una realidad debido a los costos elevados de los reactivos afectando la sostenibilidad del tratamiento, por lo que la búsqueda de soluciones más óptimas es necesaria (Trujillo Peralta *et al.*, 2023).

Tratamientos convencionales como los métodos químicos y físicos siguen siendo empleados hoy en día para dar solución a la contaminación por metales (Caviedes *et al.*, 2015). Sin embargo, estos tratamientos presentan limitaciones pues los reactivos y procesos empleados para el tratamiento de los drenajes ácidos de mina tienen costos elevados además de generar contaminantes secundarios (p.e., lodos con metales) tras la neutralización de los drenajes ácidos (Trujillo Peralta *et al.*, 2023). En ese sentido, los tratamientos biológicos tales como la bioadsorción, podrían brindar una alternativa más efectiva y sostenible para reducir estos contaminantes en los ecosistemas (Bautista, 2008). Estos métodos utilizan la capacidad de organismos tales como bacterias, hongos, levaduras, plantas para atrapar y retener metales utilizando procesos tales como la adsorción, intercambio iónico y formación de complejos (Metal - EPS) (Presentato *et al.*,

2020). Es importante mencionar que estos tratamientos suelen ser más económicos y, por lo tanto, más sostenibles, pues pueden remover metales sin generar residuos adicionales, pueden aplicarse directamente en la zona contaminada, el material biológico es accesible y en algunos casos reutilizados después de ser recuperados (Pérez *et al.*, 2018).

Considerando lo anteriormente mencionado, en esta investigación se planteó: ¿Cuál es el porcentaje de bioadsorción de metales por bacterias aisladas de sedimentos de drenajes ácidos de un túnel minero localizado en el distrito de Hualgayoc, Cajamarca 2023?, cuya hipótesis es: El porcentaje de bioadsorción de metales por bacterias aisladas de sedimentos de un túnel de mina localizado en el distrito de Hualgayoc, varía entre 20 % - 70 %, finalmente se elaboraron los siguientes objetivos: Evaluar la bioadsorción de metales por bacterias aisladas de sedimentos de un túnel minero del distrito de Hualgayoc, caracterizar fenotípicamente los aislados bacterianos provenientes de sedimentos, determinar la tolerancia a metales por los aislamientos bacterianos y determinar el porcentaje de bioadsorción de metales bioadsorbida por los aislamientos bacterianos. Se aislaron bacterias provenientes del sedimento ácido (pH 4.0) de un túnel minero en 3 medios de cultivo (R2A, CDX y LB). Así también, se determinó la tolerancia y la bioadsorción a Ca (99,9 mg/L), Mn (172,1 mg/L) y Zn (259,4 mg/L). Los resultados de esta investigación reporta nuevas estrategias para la remoción de metales empleando recursos biológicos tales como bacterias acidófilas con el fin de contribuir al desarrollo de tecnologías más sostenibles para el tratamiento de aguas residuales.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la Investigación

En China, Huang *et al.*, (2018), evaluaron las capacidades de bioadsorción y tolerancia al Mn de una cepa aislada de suelos contaminados con desechos de minerales de Mn. La cepa HM8 fue evaluada mediante pruebas de adsorción a diferentes concentraciones entre 200 – 10 000 mg/L de Mn (II), con un tiempo de contacto de 120 h, además probaron los efectos a diferentes valores de pH (3 - 9), temperatura (20 – 40 °C) y dosis de inoculación (0,1 – 3,0 mL). La cepa HM8 demostró ser capaz de tolerar hasta 5 000 mg/L de Mn y adsorber 48,54 % de Mn (II) a pH 3 en un tiempo estimado de 96 h. Este estudio demostró que la cepa HM8 tiene una alta capacidad de remoción de Mn y puede ser empleada como un bioadsorbente económico y eficaz en el tratamiento de suelos contaminados con Mn.

Rahman, Thomas y Singh, (2019), determinaron la eficiencia de la cepa AMB-2 de *Staphylococcus hominis* en el proceso de bioadsorción de Pb y Cd. La cepa fue aislada de la rizósfera del suelo contaminado por metales pesados del área industrial de Mandoli, India. Realizaron una prueba de resistencia a metales pesados como As, Cd, Cr, Hg y Pb hasta una concentración de 3000 mg/L. Además obtuvieron una biomasa viva que mostró una mayor eficiencia en la adsorción de Pb y Cd individualmente y en conjunto. En la prueba de adsorción de metales, la biomasa adsorbió hasta un 88% de Pb y un 66 % de Cd, mientras que en el sistema conjunto de metales (mezcla de Pb y Cd), la bioadsorción para Pb fue el 76% y para Cd 33%. Esta investigación concluyó que la cepa bacteriana AMB-2 puede ser utilizada en el biotratamiento de aguas contaminadas con metales pesados considerándose con un enfoque sostenible.

En Mwandira *et al.*, (2020), evaluaron el potencial de una cepa aislada de una mina abandonada en Kabwe, Zambia para la eliminación de los metales pesados Pb(II) y Zn(II). Esta cepa fue identificada como *Oceanobacillus profundus* KBZ 3-2 y fue sometida a diferentes concentraciones de metales hasta 50 mg/L y a diferentes valores de pH desde 2 a 9. Esta bacteria toleró hasta 50 mg/L de Pb y 2 mg/L de Zn, y a partir de pH 4 el aumento del porcentaje de remoción llegó a un 97% para Pb y 54% para Zn a pH 6. La adsorción de los metales se llevó a cabo por los grupos funcionales de los exopolisacáridos (EPS) excretadas por la bacteria *O. profundus* en un 87% para ambos metales y en la pared celular en 10 % para Pb y 4 % para Zn. Los autores evidenciaron que *O. profundus* tuvo una alta eficiencia en la bioadsorción de Pb y Zn y demostró que tiene un alto potencial para la biorremediación de sitios mineros contaminados.

En China Yao *et al.*, (2023), seleccionaron una cepa bacteriana proveniente del suelo contaminado con metales pesados en áreas mineras y estudiaron su capacidad de tolerancia y remoción a diferentes metales. Esta bacteria fue nombrada como LBA119 y fue identificada como *Bacillus* cuyas condiciones óptimas para el crecimiento de esta bacteria fue a pH 6 y a temperatura de 30 °C. Las concentraciones de los metales oscilaron entre 32 mg/L hasta 500 mg/L. En medio LB con 10 mg/L de Hg, la tasa de eliminación, volatilización y adsorción fue 97,32 %; 89,08 % y 8,4 % respectivamente. La cepa bacteriana LBA119 mostró una tolerancia a los metales en el siguiente orden: Pb > Mn > Zn > Cd > Cr > Hg. El estudio indicó que la cepa LBA119 tiene una alta eficiencia en la remoción de metales pesados en suelos de zonas mineras particularmente áreas contaminadas con Hg.

En el estudio de Huang *et al.*, (2023), en China, analizaron la capacidad adsorbente y oxidativa de la eliminación de Mn (II) por *Serratia marcescens* QZB-1, una cepa aislada del suelo rojo ácido en Guangxi, China. Realizaron una prueba de tolerancia bajo diferentes concentraciones de Mn (0 – 364 mM), así como análisis de EPS, espectrómetro de emisión de plasma acoplado inductivamente y actividad enzimática. La cepa QZB-1 toleró hasta 364 mM, pero con 18 mM alcanzó la mayor tasa de eliminación de 98,4 % siendo las condiciones óptimas a pH 5,5; 35 °C; 150 rpm por 48 h. Se concluyó que esta cepa puede ser utilizada para la eliminación Mn en aguas residuales.

En el estudio realizado por Firincă *et al.*, (2024), Romania, evaluaron la eficiencia de biorremediación mediante la concentración de metales antes y después del proceso. Aislaron microorganismos de suelos contaminados con metales pesados y fueron sometidos a una prueba de tolerancia a Cr, Pb y Zn a concentraciones desde 200 – 1000 mg/L, siendo *Bacillus marisflavi* y *Trichoderma longibrachiatum* los que expresaron una tolerancia a estos metales hasta la concentración de 800 mg/L, siendo el Pb el metal más tolerado por los microorganismos aislados, seguido del Zn y por último Cr, que fue el metal menos tolerado. En el ensayo de biorremediación *T. longibrachiatum* removió eliminó 87% de Cr y 67% de Zn mientras que *B. marisflavi* removió 86% de Pb. Los autores mencionan que ambos microorganismos pueden ser útiles en los procesos de biorremediación de metales pesados.

A nivel nacional no se encontraron antecedentes relacionados al tema de investigación.

2.2. Bases Teóricas

2.2.1. Bacterias acidófilas en ambientes mineros

Pese a que los ambientes de los drenaje ácido de minas son extremadamente hostiles por presentar una elevada acidez, temperatura y grandes concentraciones de sulfato y metales tóxicos, dentro de estos ambientes habitan una amplia variedad de microorganismos como algunas bacterias cuya actividad está implicada en el proceso de formación del drenaje ácido de mina (DAM) y podría ser el principal responsable de su generación (Baker y Banfield, 2003). Estos microorganismos se desarrollan en diversos microambientes como el agua, sedimentos del fondo de los drenajes y estructuras microbianas macroscópicas como mats, slimes y snottites (Méndez *et al.*, 2015).

Los condiciones en las que se forman las comunidades microbianas en los drenajes ácidos tienen relación con el pH, temperatura, concentración de metales, carbono orgánico y oxígeno disuelto, siendo el pH el que distingue a estos microorganismos del resto debido a que pueden vivir en condiciones muy ácidas y pueden metabolizar algunos compuesto como el Fe, C y S (Méndez *et al.*, 2015). En este caso las bacterias que se encuentran son demonimados acidófilos, que son organismos capaces de crecer en ambientes cuyo pH oscila entre 1-5, y pueden clasificarse como acidófilos extremos cuyo crecimiento óptimo es a $\text{pH} < 3$, acidófilos moderados, que prefieren un pH óptimo entre 3 - 5 (Barrie Johnson y Aguilera, 2019).

En los DAM se han identificado una diversidad microbiana que incluye bacterias autótrofas como heterótrofas adaptadas a condiciones extremas y con roles en los procesos de oxidación de minerales. Estas diversas líneas bacterianas pertenecen a divisiones como Proteobacterias, Nitrospira, Firmicutes y Acidobacterias. Dentro de las

proteobacterias, los grupos más estudiados está *Acidithiobacillus spp.*, *Thiobacillus spp.*, *Thiomonas sp.*, especies heterótrofas del género *Acidiphilum* como *A. cryptum*, aisladas de sedimentos alto en Fe a pH 3. Otros organismos del grupo *Leptospirillum* son comunes en los drenajes ácidos y sistemas de biolixiviación, este está dividido en tres grupos filogenéticos (I,II y III), por ejemplo *L. ferrooxidans* (grupo I) y *L. ferriohilum* (grupo II), especies pertenecientes al grupo III solo se ha detectado mediante análisis de clones (Baker y Banfield, 2003).

Dentro de los Firmicutes, incluyen un grupo *Actinobacteria* que destacan los géneros *Acidimicrobium* y *Ferromicrobium* que son heterótrofas oxidantes de Fe , y *Sulfobacillus*. Algunos ejemplos de estos géneros son: *A. ferrooxidans*, *F. acidophilus*, *S. thermosulfidooxidans* y *S. disulfidooxidans* (Baker y Banfield, 2003). El grupo *Acidobacteria* crecen en ambientes moderadamente ácidos afectados por el drenaje de minas, son heterótrofos pero también presentan fototrofia y anaerobiosis estricta, un ejemplo de este grupo es *Acidobacterium capsulatum* que fue el primer aislado de esta división (Méndez *et al.*, 2015).

2.2.1.1. Mecanismo de tolerancia a metales

Algunos metales presenta una mejor solubilidad a pH ácido que a su vez, se pueden encontrar en altas concentraciones donde los microorganismos acidófilos para sobrevivir, toleran estas concentraciones mediante mecanismos pasivos y activos (Dopson y Holmes, 2014). Los microorganismos acidófilos deben mantener un pH interno cercano a 6 incluso al estar creciendo en un medio a pH menor a 3, por lo cual deben mantener gradientes de pH entre su interior y su entorno (Valdez-Nuñez *et al.*, 2024).

Los iones libres que se encuentran en los ambientes ácidos son la forma más tóxica de los metales, sin embargo, el alto contenido de sulfato puede formar complejos con iones metálicos libres reduciendo su toxicidad y constituyendo un mecanismo pasivo para la tolerancia a metales (**Figura 1**). Otro mecanismo pasivo es el potencial de membrana interna positiva, que mediante un gradiente quimiosmótico por el cual se transportan cationes, dificulta la entrada de protones y cationes al citoplasma. Así mismo, en las condiciones de pH bajo, en la superficie celular hay una competencia por los sitios de unión entre protones y cationes metálicos, lo que ayuda a reducir la toxicidad de los metales. Por otro lado, los acidófilos pueden formar biofilms que a su vez secretan sustancias poliméricas extracelulares que ayudan a absorber metales brindando una mayor tolerancia hacia los metales (Dopson y Holmes, 2014).

Los mecanismos activos están más relacionados a la resistencia de metales, estos incluyen a las bombas de eflujo que utilizan ATP o el gradientes de protones para expulsar los metales de la célula (**Fig 1**). Otros acidófilos convierten especies metálicas tóxicas en formas menos dañinas a través de procesos enzimáticos, como la reducción de Hg^{2+} a Hg^0 . También pueden secuestrar el metal de manera no activa en el citoplasma mediante polifosfatos inorgánicos como es en el caso del cobre (Dopson y Holmes, 2014).

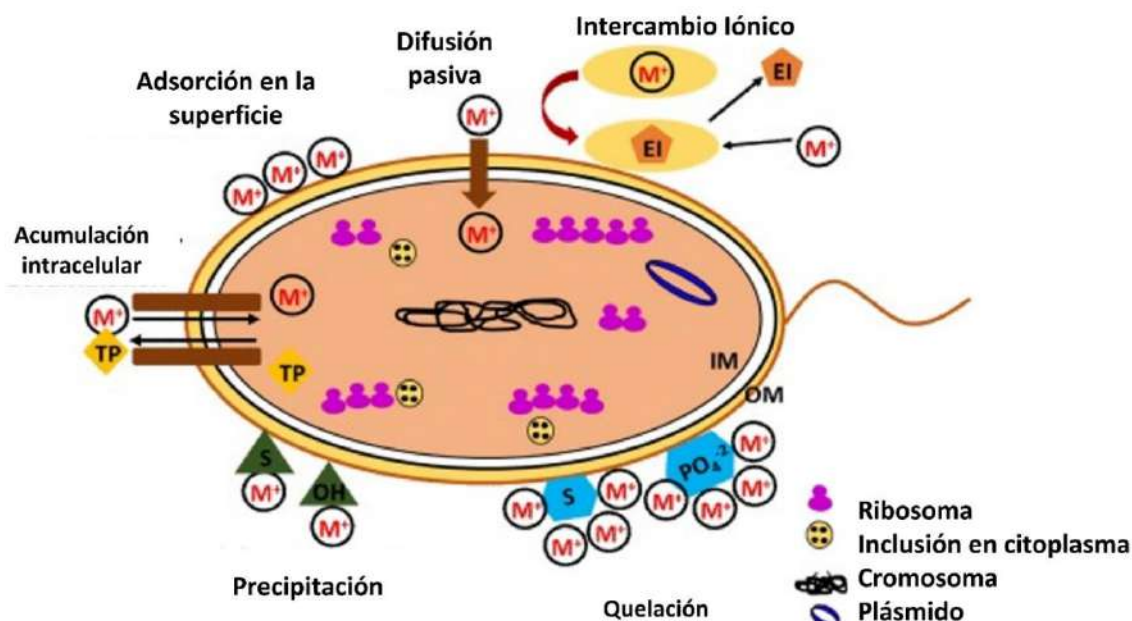


Figura 1. Mecanismos de tolerancia pasiva y activa a metales por bacterias (Trujillo Peralta *et al.*, 2023).

2.2.2. Bacterias y bioadsorción de metales

Durante muchos años el término biosorción ha sido empleado para referirse a procesos que tienen la finalidad de eliminar sustancias de una solución utilizando un material biológico gracias a las propiedades que tienen los microorganismos vivos y muertos, y que a lo largo de los años muchos estudios han enfocado su uso para el tratamiento de contaminantes. Sin embargo, este término hace referencia a dos procesos como la bioadsorción y bioabsorción dentro de su definición y es preciso hacer notar la diferencia entre ambos términos (Fomina y Gadd, 2014).

El término adsorción hace referencia a un proceso de atracción por parte de un adsorbente que sucede en la superficie gracias a una fuerza química que existe entre un adsorbente y un adsorbato (Gadd, 2009). La bioadsorción es un proceso en el cual se utiliza un material

biológico como bacterias, hongos, levaduras, residuos orgánicos, etc., que adhieren y retienen a iones o moléculas sobre la superficie del material biológico suspendidos en una solución líquida. Este proceso se caracteriza por ser pasivo y no dependiente del metabolismo, cuya interacción ocurre entre los grupos funcionales de la superficie biológica con los iones o moléculas del contaminante (ej. metales pesados) (**Figura 2**), a través de diferentes mecanismos como el intercambio iónico, atracción electrostática o interacción química (Fomina y Gadd, 2014).

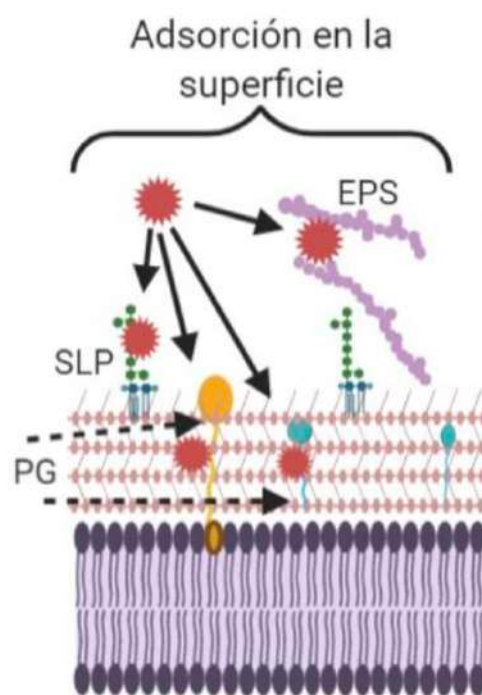


Figura 2. Interacción de los metales con la estructura de la pared celular bacteriana, proteínas de la superficie de pared celular (SLP), los peptidoglicanos (PG) y exopolisacáridos (EPS). Modificado de (Forteza Guillot, 2020).

2.2.2.1. Diferencia entre bioadsorción y bioacumulación

La bioacumulación es un proceso activo dependiente del metabolismo que absorbe elementos en el interior de la célula llevada a cabo por microorganismos vivos, activos

genéticamente para transportar iones de metales u otro contaminantes y adaptarse fisiológicamente en presencia de estos compuestos, al tener una alta demanda de energía el procedimiento es lento (**Tabla 1**), este término es igual a bioabsorción según algunos autores por tener la misma definición (Presentato *et al.*, 2020).

En el caso de la bioadsorción, los microorganismos que se utilizan están vivos y muertos y el proceso es mucho más rápido. Se inicia primero con el proceso de adsorción de los grupos funcionales de la pared celular y cuando la tasa de bioadsorción supera la tasa de eliminación entra en acción la bioacumulación transportando las especies metálicas al citoplasma, aquí el proceso es más complejo que involucra algunas estructuras internas de la célula, características genéticas y procesos enzimáticos (Pham *et al.*, 2022).

Otra diferencia que presentan ambas es el pH y temperatura en la que se desarrolla estos procesos. Para la bioadsorción, el pH y la temperatura puede ocurrir en un amplio rango, mientras que en la bioacumulación es más sensible a ambos factores ya que puede cambiar el estado de la células vivas (Pham *et al.*, 2022).

Tabla 1. Diferencia entre bioadsorción y bioacumulación (Adaptado de Pham *et al.*, 2022)

Bioadsorción	Bioacumulación
Proceso pasivo independiente del metabolismo	Proceso activo que requiere energía metabólica
Uso de biomasa viva o muerta	Sólo requiere de microorganismo vivos activos
Adsorbe el contaminante en la superficie del organismo mediante interacciones físicoquímicas	La célula absorbe en su interior el contaminante por transporte activo y reacciones metabólicas
Proceso que ocurre de manera rápida al ser superficial	Proceso que ocurre de manera lenta por los procesos metabólicos

No es afectada drásticamente en condiciones ambientales extremas	Se puede ver afectada por factores como pH, temperatura y oxígeno
--	---

2.2.2.2. Interacción de la pared celular en la adsorción de metales

Las bacterias según la composición y grosor de su pared celular se dividen en Gram positivas y Gram negativas, las cuales son importantes al momento de la bioadsorción. Ambas contienen grupos funcionales similares como el carboxilo, hidroxilo y fosforilo que interactúan en la adsorción de metales (Ali Redha, 2020).

Las bacterias Gram positivas tienen una pared más gruesa compuesta por peptidoglicano que constituye el 50 % del peso de la pared, tiene una alta densidad de carga negativa gracias a los ácidos teicoicos y teicurónicos los cuales contribuyen en la unión de los metales porque ofrecen numerosos sitios funcionales permitiendo una mayor capacidad de adsorción en especial a pH ácido, estos grupos se desprotonan y generan cargas negativas que facilitan la unión de los iones metálicos (Johnson, Cygan and Fein, 2006; Ali Redha, 2020). Las bacterias Gram negativas tienen una pared celular más delgada que las Gram positivas pero está protegida por una membrana externa que presenta lipopolisacáridos que también aporta sitios de adsorción pero en menor cantidad (Johnson, Cygan y Fein, 2006).

2.2.2.3. Mecanismos de la bioadsorción

En la bioadsorción involucra múltiples mecanismo como la adsorción, intercambio iónico y complejación así como la producción de sideróforos (**Figura 3**). Estos procesos dependen de los grupos funcionales de la biomasa bacteriana (carboxilo, fosfatos, aminoácidos, etc.) que interactúan con metales dependiendo del pH del medio y las propiedades químicas, así como también como la carga, el tamaño molecular e

hidrofobicidad. Al utilizar material biológico vivo, actividades metabólicas como transporte activo y actividades redox también pueden influir. Los iones metálicos suelen tener una mayor tendencia de bioadsorción cuando están en condiciones ácidas, los iones metálicos pueden unirse a un único grupo funcional en la superficie o interactuar simultáneamente con dos grupos funcionales (Gadd, 2009).

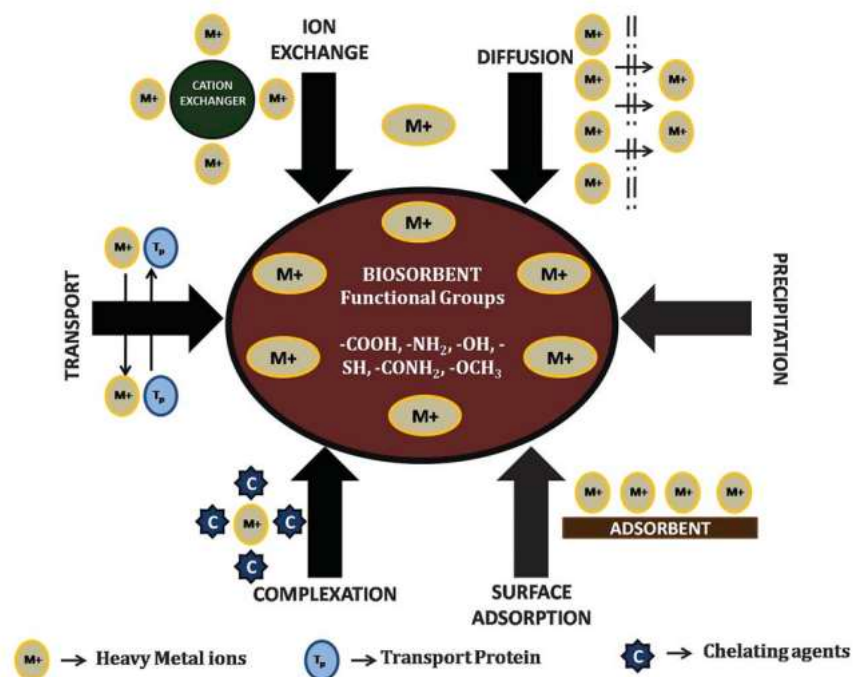


Figura 3. Mecanismos de bioadsorción (Gaur *et al.*, 2014).

2.2.2.3.1. Adsorción física

La adsorción física es el proceso que se basa en la interacción electrostática como las fuerzas de Van der Waals que ocurre en la superficie del bioadsorbente, como las paredes celulares de las bacterias donde el área superficial y el pH influyen en este mecanismo (Ali Redha, 2020).

2.2.2.3.2. Intercambio iónico

El intercambio iónico es la sustitución de un ion metálico unido a una fase sólida intercambiado por otro ion de una solución, esto se da gracias a los polisacáridos en las paredes celulares que pueden intercambiar sus contriones (Ali Redha, 2020).

2.2.2.3.3. Complejación

La complejación es la formación de complejos entre iones metálicos y moléculas orgánicas (ligandos) mediante enlaces covalentes o atracción electrostática. Una forma avanzada de este proceso es la quelación en la cual el ion metálico se une al ligando de múltiples formas para formar complejos más estables (Ali Redha, 2020).

2.2.2.3.4. Producción de sideróforos

Los sideróforos son moléculas con elevada afinidad hacia el metal Fe, las bacterias también pueden emplear estas moléculas para unir o quelar otros metales, estos complejos sideróforo – metal ayuda a reducir las concentraciones de metales libres en el ambiente ya que no pueden ingresar a las células bacterianas (Hesse *et al.*, 2018). Los sideróforos son efectivos para aumentar la movilidad de algunos metales como Cd, Zn, Mn, Pb, Cu, entre otros y esto se debe a la fuerte afinidad o selectividad que pueden tener los sideróforos hacia metales diferentes al Fe (Ahmed y Holmström, 2014).

2.2.3. Metales en los drenajes ácidos de mina (DAM)

Los drenajes ácidos de mina (DAM) son vertimientos generados por las actividades mineras que afectan la calidad de agua al contaminar fuentes hídricas superficiales y acuíferos subterráneos (Chaparro, 2015). Se caracterizan por tener un bajo pH que oscila entre 1,5 y 6 que genera una gran acidez por la formación de ácido sulfúrico y metales

pesados disueltos (**Tabla 2**) que superan los límites máximos permisibles causando impacto en el ambiente y en la salud de las personas (Zamora y Meza, 2022) (Chaparro, 2015).

El DAM se forma cuando se oxidan los minerales sulfurados al estar expuestos al agua y oxígeno que es acelerado por las actividades mineras. Los sulfuros se transforman en sulfatos de hierros solubles en la superficie de las rocas, estas formaciones son disueltas e hidrolizadas con la lluvia produciendo aguas ácidas. Sulfatos de Mg, Ca y Fe son originados cuando se depositan los iones disueltos en los drenajes formando masas sólidas. Cuando el flujo del DAM cesa, el agua subterránea vuelve a circular por las rocas, lo que da paso a la disolución de los sulfatos acumulados contaminando nuevamente el lugar. Al liberarse los iones ferrosos se oxidan a férrico formando oxihidróxicos que dan lugar al color ocre amarillento característicos de estos sitios (Tovar Pacheco, 2003).

La oxidación de minerales sulfurosos como la pirita generan ácido sulfúrico, lo cual facilita la liberación de diversos metales como Fe, Mn, Al, Cu, Pb, Zn, Cd, Ca, Hg, As, Mg y otros, siendo Fe, Al y Mn los que actúan como generadores de ácidos ya que pueden producir hidrogeniones (H^+) en los procesos de oxidación, y al ser estos metales liberados a las cuerpos de agua provocan un cambio en la calidad ambiental (Aduvire, 2018; Patiño, 2022).

Tabla 2. Características de los drenajes ácidos de mina (Baldeon, 2022).

Propiedades	Componentes Químicos Típicos Asociados	Intervalo de Concentración	Impacto
Acidez	Ácido Sulfúrico	2,0 – 4,0 (pH)	Movilizan los iones metálicos.
Hierro	“Iones ferroso y férrico, óxido férrico, hidróxidos”	100 – 3000 mg/L	Palidez y Turbidez de las aguas. Aumento del pH, precipitación de hierro.
Metales pesados	Cu, Mg, Zn, Cd, Hg, Pb, As	1 – 200 mg/L	Reduce la flora y fauna acuática, bioacumulan y reducen la calidad de abastecimiento de agua potable.
Sólidos Totales	Ca, Mn, Al, SO ₄	100 – 30 000 mg/L	Reducen la calidad del agua en el abastecimiento

El DAM cuando alcanza un estado de acidificación alta, la oxidación de los sulfuros de Fe pasa a ser un proceso secundario ya que la oxidación mediada por algunos microorganismos tiende a ser el proceso principal. Una diversidad de bacterias acidófilas y quimiolitotrofas, como *Acithiobacillus ferrooxidans*, obtienen su energía a través de la oxidación del Fe. Estas bacterias tienen la capacidad de aumentar la reacción involucrada en la generación de drenajes ácidos (Chaparro, 2015).

Estándares de calidad del agua y límites máximos permisibles para el sector minero

Los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para agua establecidos en el decreto supremo N° 004 - 2017 – MINAM (**Tabla 3**), se utiliza para referenciar las concentraciones máximas de elementos químicos como los metales pesados, compuestos

orgánicos y microorganismos presentes en los cuerpos de agua que se pueden encontrar aguas arriba de las operaciones mineras o en zonas cercanas a los proyectos mineros, y fuentes como lagunas, quebradas y ríos pueden recibir descargar provenientes de las actividades mineras, además los Límites Máximos Permisibles (LMP) (**Tabla 4**) regulan los efluentes de mina que son descargados dentro de las operaciones mineras (Aduvire, 2023).

Ambas normativas son establecidas por el Ministerio de Ambiente y miden las concentraciones de parámetros físicos, químicos y biológicos, presencia de elementos o sustancias presentes en un efluente, si llegan a superar los valores establecidos pueden causar daño a la salud y al ambiente (Aduvire, 2023).

Tabla 3 . Estándares de Calidad Ambiental en agua, decreto supremo N° 004 - 2017 – MINAM, categoría 4 conservación del ambiente acuático modificado de (MINAM, 2017).

Parámetros	Unidad de medida	E2: Ríos (Sierra)
Demanda bioquímica de Oxígeno	mg/L	10
Potencial de hidrógeno (pH)	Unidad de pH	6,5 - 9
Sulfuros	mg/L	0,002
Temperatura	°C	3
Antimonio	mg/L	0,64
Arsénico	mg/L	0,15
Bario	mg/L	0,7

Cadmio disuelto	mg/L	0,00025
Cobre	mg/L	0,1
Cromo VI	mg/L	0,011
Mercurio	mg/L	0,0001
Níquel	mg/L	0,052
Plomo	mg/L	0,0025
Zinc	mg/L	0,12

Tabla 4. Límites Máximos Permisibles para la descarga de efluentes líquidos de actividades minero – metalúrgica modificada (Patiño, 2022).

Parámetro	Unidad	Límite en cualquier momento	Límite para el promedio anual
pH	Unidad de pH	6 - 9	6 - 9
Sólidos totales en suspensión	mg/L	50	25
Arsénico total	mg/L	0,1	0,08
Cadmio total	mg/L	0,05	0,04
Cobre total	mg/L	0,5	0,4
Hierro	mg/L	2	1,6
Plomo	mg/L	0,2	0,16
Mercurio	mg/L	0,002	0,0016
Zin	mg/L	1,5	1,2

2.2.4. Acumulación de manganeso, zinc y calcio en el ambiente

Manganeso

El manganeso es reconocido como un contaminante ambiental más abundante que provoca riesgos en el medio ambiente como trastornos neurodegenerativos y al estar expuesto es inhalado por estar distribuido en el ambiente (Harischandra *et al.*, 2019). Se puede encontrar en suelos, sedimento y materiales biológicos con una amplia variedad de estados de oxidación cuya disponibilidad depende del pH del medio y condiciones redox (Li *et al.*, 2019). En altas concentraciones el metal es de gran riesgo en la salud humana, plantas y microorganismos, cuya acumulación tóxica logra ingresar en la cadena alimentaria provocando efectos cancerígenos, neurodegenerativos, disfunción mitocondrial y estrés oxidativo (Huang *et al.*, 2018).

Zinc

Es uno de los metales que se encuentra en las aguas industriales provenientes de las actividades como la minería o la galvanoplastia, al reaccionar el Zn con productos químicos forman compuestos tóxicos dañando a los sistemas biológicos cercanos (Medfu Tarekegn, Zewdu Salilih y Ishetu, 2020). En bajas concentraciones actúa como un micronutriente esencial pero al estar expuesta excesivamente es perjudicial para la salud humana que genera síntomas como vómitos, ictericia, insuficiencia hepática, diarrea, insuficiencia renal, entre otros (Bashir *et al.*, 2019).

Calcio

Algunos minerales pueden contribuir a neutralizar el drenaje ácido de mina, destacándose los carbonatos de Ca, Mg y Fe por su gran capacidad de neutralización, pero los óxidos e hidróxidos de los mismos tienen un bajo efecto neutralizante (Zamora y Meza, 2022). Estos

minerales suelen encontrarse en las rocas carbonatadas y al fluir las aguas ácidas que contienen sulfatos causan dureza en el agua elevando el pH e impidiendo que los metales disueltos lleguen a precipitar (Tovar Pacheco, 2003). La dureza del agua se debe a la presencia de iones metálicos divalentes, como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Fe^{2+} así como los aniones de sulfatos, bicarbonato, cloruros y nitratos (Soto, 2010). Además en el proceso de bioadsorción, el calcio es el mayor competidor por los sitios de unión en la superficie celular contra los otros metales que están en el suelo contaminado (Presentato *et al.*, 2020).

CAPÍTULO III

DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE LA HIPÓTESIS

3.1. Nivel de investigación

Explicativo: Hubo relaciones de causa y efecto entre las bacterias de sedimentos y la bioadsorción de metales.

3.2. Tipo y diseño de estudio

3.2.1. Tipo de investigación

Básica: Esta investigación se enfocó a generar nuevos conocimientos acerca de la bioadsorción de metales por aislados bacterianos.

3.2.2. Diseño de investigación

Cuasi-experimental: Porque se manipuló la variable independiente para observar la relación con la variable dependiente.

3.3. Material biológico

Conformado por las bacterias presentes en las muestras de los sedimentos de un túnel minero del distrito de Hualgayoc, Cajamarca. La unidad de análisis estuvo constituida por cada aislamiento bacteriano obtenido a partir del sedimento del túnel minero.

3.4. Descripción del sitio de muestreo y análisis fisicoquímicas

El muestreo se llevó a cabo en un túnel minero abandonado, ubicado en en el distrito de Hualgayoc, Cajamarca (**Figura 4**), cuyas coordenadas son: 6°45'27"S, 78°35'06"W .

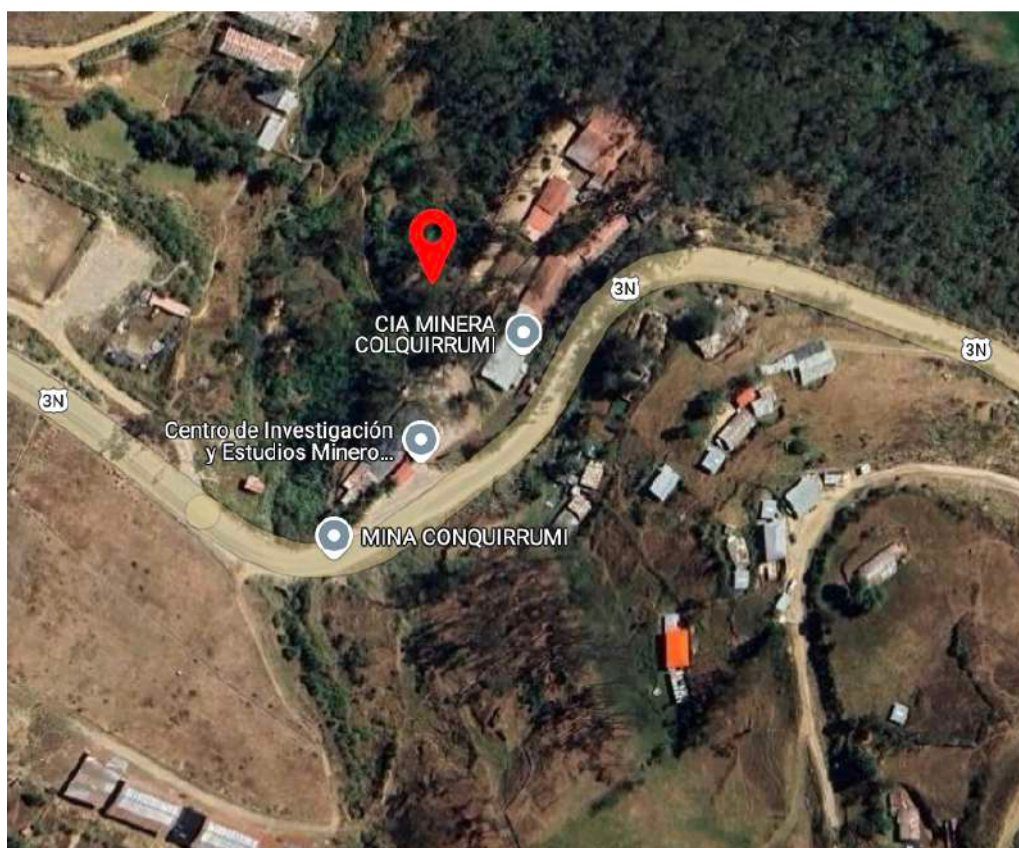


Figura 4. Ubicación geográfica del sitio de muestreo en el distrito de Hualgayoc - Cajamarca. Fuente Google Earth.

En el interior del túnel se establecieron 2 puntos de muestreo denominados PM1 y PM2 (**Apéndice 1**), donde se recolectaron las muestras de sedimento empleando jeringas estériles de 50 mL que luego fueron selladas con Parafilm (**Apéndice 2**). En el agua se midió parámetros como el pH y ORP *in situ* empleando un potenciómetro Hanna HI2002 (Hanna Instruments, EE.UU) acoplado a un electrodo HI11310 con una referencia de Ag/AgCl. Las muestras fueron rotuladas y trasladadas en un cooler hasta el laboratorio de Biotecnología 1D-201 de la Universidad Nacional de Cajamarca donde se almacenaron a 4 °C. En el laboratorio, se midió el pH de los sedimentos empleando una solución de CaCl_2 0,01M (1:1). El tiempo de agitación del sedimento en la solución de CaCl_2 fue de 1 min y el tiempo de reposo fue 30 min. Finalmente se midió el pH introduciendo el electrodo del potenciómetro en el sobrenadante.

3.5. Aislamiento y caracterización microbiológica de los aislados bacterianos

3.5.1. Enriquecimiento y aislamiento bacteriano

Para el enriquecimiento de las muestras de sedimento se utilizó tres medios de cultivo: Czapeck-Dox (CDX) (HIMEDIA, India), R2A (HIMEDIA, India), y Luria bertani (LB) (HIMEDIA, India) (**Anexo 1**), con la finalidad de aislar diferentes metabolismos bacterianos. El primer medio se empleó para enriquecer actinomicetos debido a que el medio favorece el crecimiento de estos microorganismo que utilizan como fuente de nitrógeno al nitrato (proveniente del guano de murciélago), el segundo para bacterias de crecimiento lento y/o oligótrofos debido a que el medio brinda esa poca cantidad de nutrientes e imita las condiciones del lugar del muestreo (poca fuente de carbono) y el tercero para enriquecer bacterias heterótrofas debido a que es un medio rico en nutrientes que permite el crecimiento de estas bacterias degradadoras de materia orgánica (madera y guano).

Se preparó por duplicado 50 mL de cada medio de cultivo en frascos de vidrio de 250 mL, el pH se ajustó a 4,0 y fueron esterilizados en autoclave a 121 °C por 20 min. Posteriormente, se inoculó el 10 % de un mix de sedimentos (PM1 y PM2) en cada frasco, se incubaron a 30°C y se agitaron diariamente (~5 min) de forma manual para homogenizar los medios de cultivo y el mix de sedimento durante 10 días.

Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron transferencias a medios de cultivo frescos (CDX, R2A y LB) con la finalidad de obtener solo enriquecimientos bacterianos sin la presencia de otros microorganismos. Para ello, se preparó 90 mL de cada medio por triplicado a pH 4,0 en frascos de 250 mL y fueron esterilizados en autoclave. Se transfirió el 10% del inóculo (enriquecimiento) a las botellas con medio fresco y se

incubaron bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Después se colectaron muestras de la última transferencia y se sembraron en los medios R2A (1,8% agarosa), CDX (1,8% agar) y LB (2,0% agar), los medios se incubaron a 30°C por 48 h. En el caso del medio R2A se utilizó agarosa debido a que el medio no gelificó con agar. Las colonias obtenidas fueron seleccionadas y transferidas a placas nuevas para obtener aislamientos puros.

3.5.2. Caracterización microbiológica de los aislamientos

La caracterización macroscópica se basó en la descripción de la colonia (tamaño, forma, pigmentación, brillo, elevación, consistencia y transparencia al paso de la luz) (Bautista, 2008). La caracterización microscópica se realizó mediante tinciones específicas, Gram y esporas. La producción de sideróforos se evaluó mediante el ensayo overlaid CAS (O-CAS) según Pérez-Miranda *et al.*, (2007) (**Figura 5**). Para este último se empleó material de plástico y de vidrio, el cual fue tratado previamente con HCl 6M por 48 h y luego enjuagado con agua destilada con la finalidad de eliminar el hierro presente (Louden, Haarmann and Lynne, 2011). Se empleó como inóculo los aislamientos bacterianos incubados en los caldos de cultivo CDX, R2A y LB previamente desferrados durante 48 h. Primero se vertió los medios de cultivo desferrados, correspondiente para cada cepa (CDX, R2A y LB), y luego se sembraron los aislamientos hasta observar su crecimiento (30 °C por 24 – 48 h). Posteriormente, se superpuso una capa adicional de agar CAS (Cromo Azurol S) (**Anexo 2**) y se incubó a 30 °C por 4 días hasta observar cambios. El resultado se determina como positivo, cuando se genera un cambio de coloración (de azul a naranja) del medio CAS.

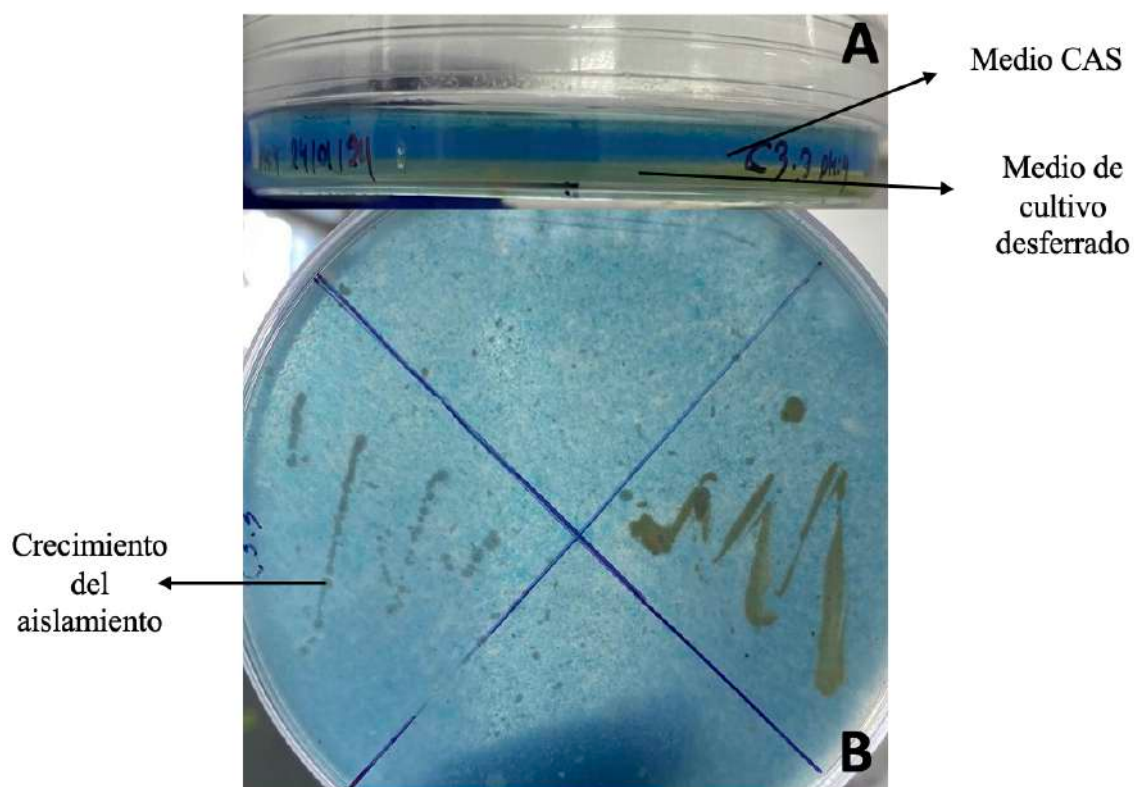


Figura 5. Ensayo Overlaid - CAS. A) Observación de la primera capa con el medio de cultivo desferrado y la segunda capa superpuesta con el medio CAS. B) Fotografía frontal de la placa después de la superposición del medio CAS sobre el aislamiento bacteriano que creció a las 48 h. El tiempo de incubación fue de 4 días a 30 °C hasta observar cambios de coloración en el medio CAS.

3.6. Ensayo de tolerancia a metales y formación del consorcio bacteriano

3.6.1. Ensayo de tolerancia a metales

El ensayo se realizó empleando 3 diferentes concentraciones de Mn, Zn y Ca, las cuales se observan en la **Tabla 5**. Las concentraciones empleadas para este ensayo fueron determinadas en base a las concentraciones de los metales encontrados en el túnel minero (data no publicada).

El ensayo se realizó por duplicado en viales con 27 mL de cada medio de cultivo utilizado anteriormente (R2A, CDX y LB) a pH 4 los cuales fueron suplementados con una solución stock de cada metal (**Apéndice 3**) para obtener la concentración deseada (**Tabla 5**). Finalmente se inoculó 3 mL de cada cultivo bacteriano previamente reactivado (24 h) en su respectivo medio a pH 4 considerando la concentración celular de cada aislamiento estimado (**Apéndice 4**). Los viales fueron incubados a 30 °C durante un periodo de 48 a 72 horas. La tolerancia se comprobó a través de la concentración celular la cual se analizó en un fotómetro (Spectroquant Move 100, Merck) a una longitud de onda de 610 nm (**Apéndice 4**).

Tabla 5. Concentración de metales empleados en el ensayo de tolerancia. Concentración 1 (C1), concentración 2 (C2) y concentración 3 (C3).

Metal	Concentración	mg/L
Zn	C1	86,4
	C2	172,9
	C3	259,4
Mn	C1	57,3
	C2	114,7
	C3	172,1
Ca	C1	33,3
	C2	66,6
	C3	99,9

3.6.2. Formación del consorcio bacteriano

Para la formación del consorcio bacteriano se tomó en cuenta los resultados obtenidos en el ensayo de tolerancia a metales. Se seleccionó aquellos aislamientos que fueron capaces de tolerar más de un metal, así como su concentración más alta (C3). Los aislamientos

seleccionados fueron reactivados en sus medios de cultivo correspondientes e incubados bajo condiciones estándares (30 °C por 24 h). Luego, se determinó la concentración celular de cada aislamiento (**Apéndice 4**) y se inoculó 3 mL de cada cultivo en 30 mL de medio R2A.

3.7. Ensayo de bioadsorción de metales

3.7.1. Diseño del experimento

Se preparó una solución stock mixta de Mn, Zn, y Ca a pH 4.0. La concentración del mix de metales consistió en la agrupación de la concentración más alta de cada metal (C3). El ensayo de bioadsorción se realizó en 215 mL de caldo R2A (medio de cultivo en el cual el consorcio logró crecer) en frascos de 500 mL a pH 4 al cual se le agregó con un filtro de jeringa 10 mL de la solución stock mixta de metales a este medio de cultivo. Posteriormente, se inoculó el 10 % (25 mL) del consorcio bacteriano elaborado anteriormente. Las botellas se incubaron durante 30 días a 30 °C, monitoreándose el pH cada 10 días. Finalmente, se elaboró un control negativo conformado solo por el medio R2A y metales. El experimento se realizó por triplicado.

3.7.2. Análisis de metales disueltos

Se colectó 40 mL de cada frasco (cultivo y control) en tubos Falcon de 50 mL. El volumen se centrifugó a 8000 rpm por 15 min para obtener el sobrenadante en cual se encontraba los iones metálicos que no fueron removidos por el consorcio (Trujillo Peralta *et al.*, 2023). Los sobrenadantes se preservaron con 15 gotas de ácido nítrico (HNO₃ 1:1) y enviados al laboratorio SGS – Perú, sede Cajamarca para el análisis de concentración de metales disueltos (método EPA) (**Anexo 3**), realizado mediante espectrometría de masas con plasma acoplado individualmente (Slavin *et al.*, 2017). El porcentaje de bioadsorción

de metales fue calculado de acuerdo a (Malkoc, Kaynak and Guven, 2016) utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ bioadsorción} = \left(\frac{C_o - C_f}{C_o} \right) \times 100$$

Donde:

C_o : Concentración inicial de los iones metálicos (mg/L)

C_f : Concentración final de los metal en el medio de cultivo (mg/L).

3.2. Procesamiento y análisis de datos

Los datos obtenidos del ensayo de bioadsorción de metales se realizaron por duplicados y los valores obtenidos se promediaron para el procesamiento de datos. El análisis de la normalidad de los datos se realizó mediante la prueba de Shapiro Wilk, para saber si los datos siguen una distribución normal. Se aplicó una prueba no paramétrica de Friedman para analizar los datos de las medidas repetidas, con un nivel de confianza del 95% y un $p < 0.05$; para establecer diferencias estadísticas significativas. El procesamiento de los datos y la construcción de gráficos se realizó de manera computarizado mediante la utilización del software “OriginPro 2024b (64-bit) 10.1.5.132 (Learnign Edition).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados

4.1.1. Características fisicoquímicas de las muestras

El pH del agua en PM1 y PM2 fue de 3,2 y 3,1; y el ORP de + 397,0 y + 534,8 mV, respectivamente. El pH en los sedimentos en PM1 y PM2 fue de 3,3 y 3,2, respectivamente. Además, la concentración de cada metal encontrado en las muestras de agua fue: 99,9 mg/L Ca; 259,4 mg/L Zn y 172,1 mg/L Mn.

4.1.2. Aislamiento y caracterización microbiológica de los aislamientos bacterianos

Se aislaron un total de 8 aislamientos bacterianos provenientes del mix de los sedimentos PM1 y PM2. Las bacterias se clasificaron como acidófilos moderados (microorganismos con un pH óptimo de crecimiento entre 3 y 5). Las características microbiológicas de los aislamientos bacterianos obtenidos se muestran en la **Tabla 6 y Apéndice 5 y 6**.

Tabla 6. Caracterización macroscópica (colonial), microscópica y producción de sideróforos de los aislados bacterianos.

Código	Medios de cultivo	Características macroscópicas (colonial)							Características microscópicas			Producción de sideróforos
		Tamaño	Forma	Pigmentación	Brillo	Transparencia	Elevación	Consistencia	Gram	Forma	Formación de esporas	
A1P	R2A	Puntiforme	Circular	Blanca no pigmentado	Sin brillo	Transparente	Plana	Suave - mucoside	-	Bacilos cortos, delgados y pequeños	No	No
A3.2	R2A	Pequeña	Circular	Blanca	Sin brillo	Opaca	Plana	Suave	+	Cocobacilos	No	No
2A	R2A	Puntiforme	Circular	Blanca	Sin brillo	Transparente	Plana	Suave	-	Bacilos cortos, delgados y pequeños	No	No
C2	CDX	Mediana	Irregular	Crema	Sin brillo	Opaca	Plana	Suave	+	Bacilos dispuestos en cadena corta	Sí	No
C3.3	CDX	Mediana	circular	Crema	Brillante	Opaca	Plana	Suave	+	Bacilos	Sí	Sí
L1	LB	Mediana	Circular	Crema	Brillante	Opaca	Plana	Suave	+	Bacilos	Sí	No
LH	LB	Grande	Rizoide	Crema	Sin brillo	Opaca	Plana	Dura	+	Bacilos dispuestos en cadena	Sí	No
C4	CDX	Mediana	Circular	Amarilla	Brillante	Opaca	Elevada	Suave	+	Bacilos	No	No

4.1.3. Ensayo de tolerancia a metales

En el ensayo de tolerancia a metales se emplearon tres concentraciones diferentes de Mn, Zn y Ca para cada aislamiento bacteriano (**Tabla 5**), a pH 4 e incubado a 30 °C durante 48 h. En cuanto al Zn se observó que a medida que aumenta la concentración de este metal, la concentración celular de los aislamientos va disminuyendo tal como se observa en la **Figura 4**. Los aislamientos que toleraron mejor la C3 de Zn fueron C4 , LH, y A1P con valores de $5,17 \times 10^6$ UFC/mL; $2,15 \times 10^6$ UFC/mL y $6,79 \times 10^6$ UFC/mL respectivamente.

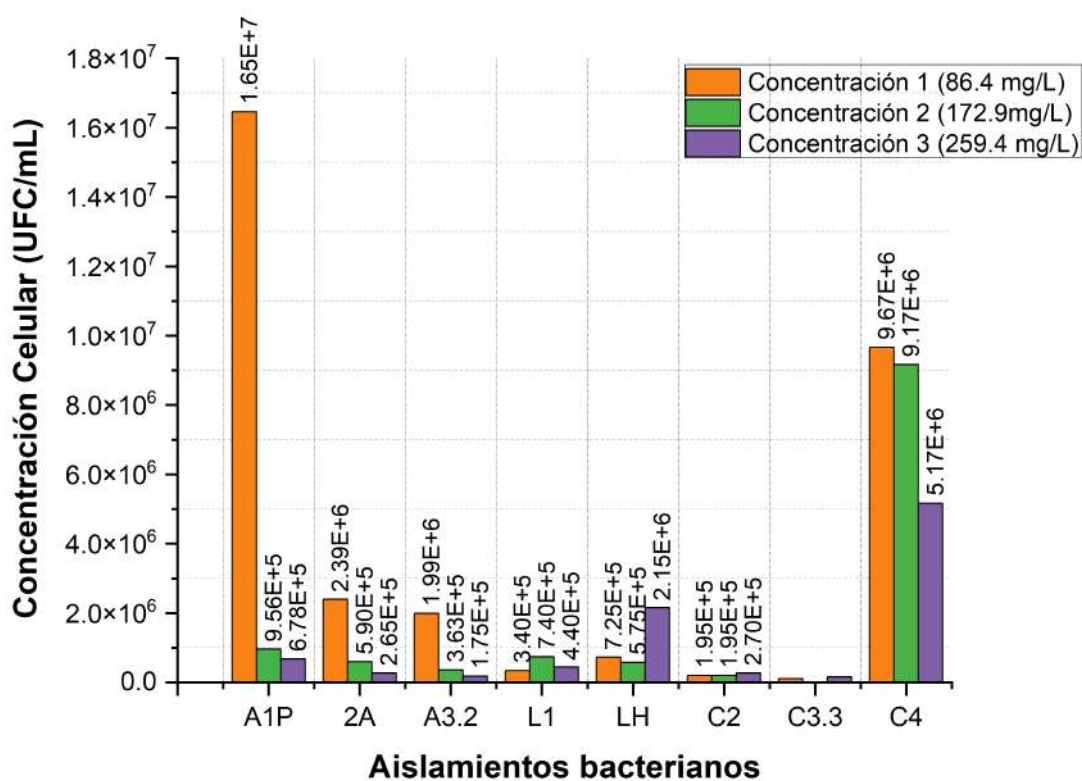


Figura 4. Concentración celular de los aislados bacterianos al final del ensayo de tolerancia a 3 diferentes concentraciones de Zn.

Respecto al Mn (**figura 5**), los aislamientos A3.2, C4 y A1P toleraron las 3 concentraciones evaluadas, obteniendo concentraciones celulares respectivas de $1,41 \times$

10^8 UFC/mL; $6,53 \times 10^7$ UFC/mL y $6,57 \times 10^6$ UFC/mL ante la C3. Los aislamientos L1, LH y C2 no lograron crecer en ninguna de las 3 concentraciones.

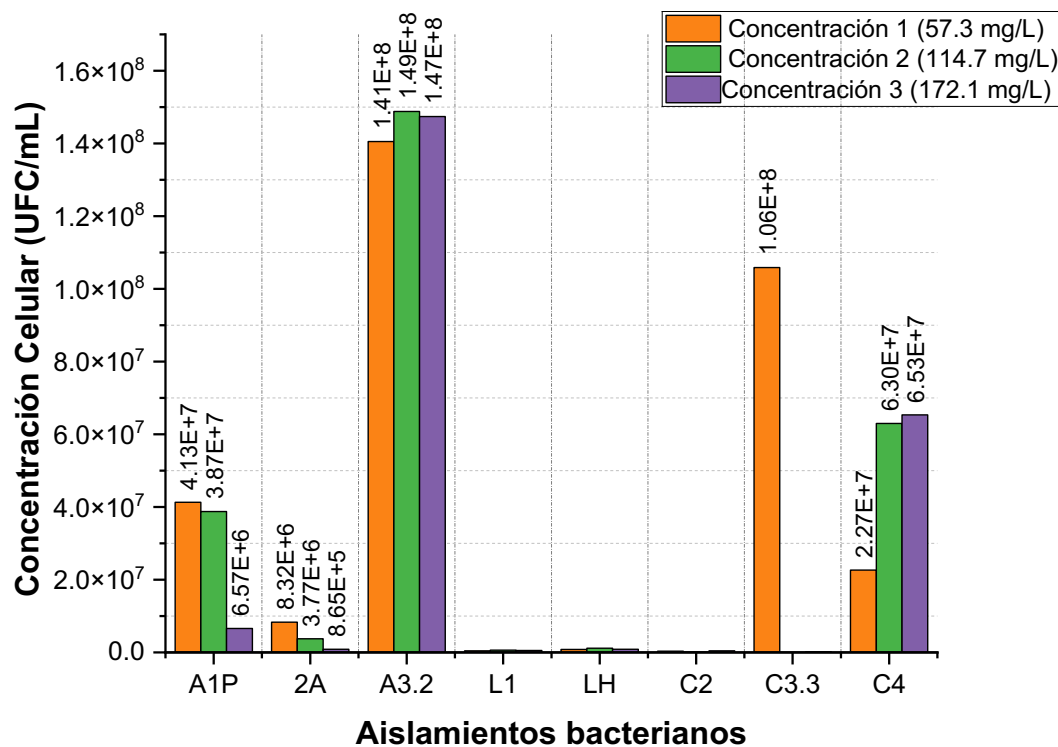


Figura 5. Concentración celular de los aislados bacterianos al final del ensayo de tolerancia a 3 diferentes concentraciones Mn.

En cuanto a la tolerancia al Ca, los aislamientos A1P, 2A, A3.2 y C4 obtuvieron hasta $1,38 \times 10^8$ UFC/mL en la concentración máxima (C3), tal como se observa en la **Figura 6**. Los demás aislamientos no presentaron crecimiento alguno en las 3 diferentes concentraciones.

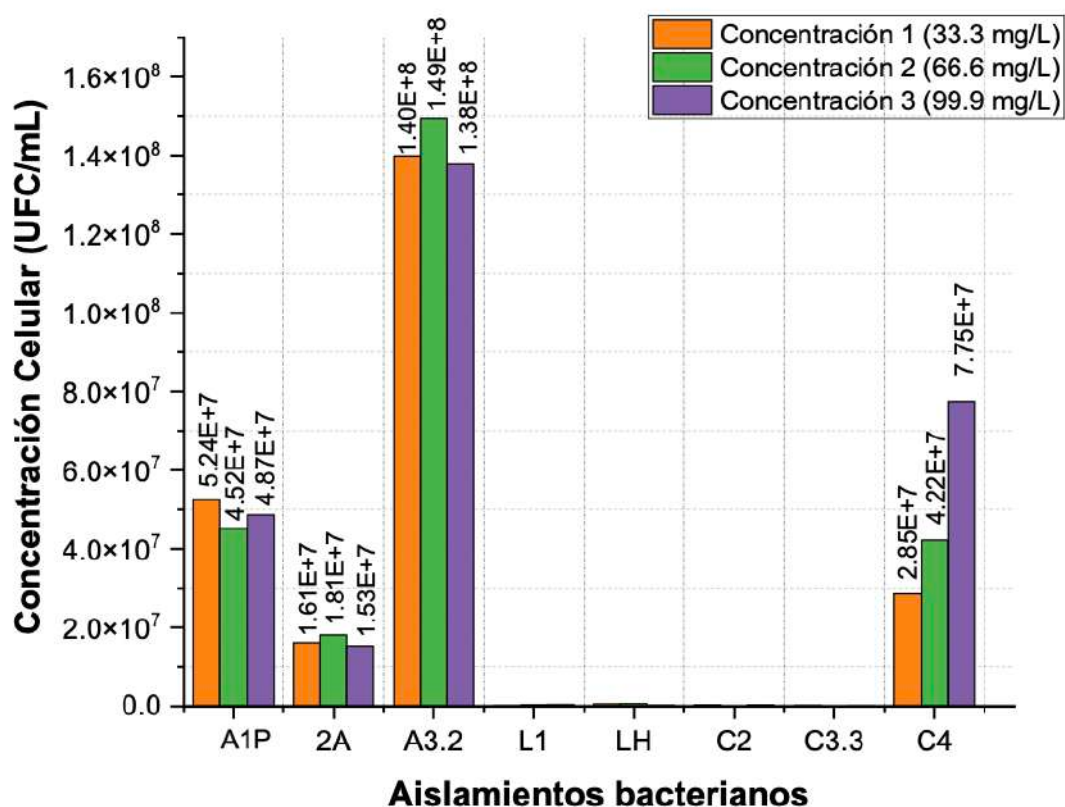


Figura 6. Concentración celular de los aislados bacterianos al final del ensayo de tolerancia a 3 diferentes concentraciones de Ca.

4.1.3.1. Formación del consorcio bacteriano

El consorcio estuvo conformado por aquellos aislamientos bacterianos que toleraron más de un metal así como su máxima concentración (C3). En la **Tabla 7**, se muestra los aislamientos seleccionados según los criterios mencionados anteriormente. Además, se consideró que los aislamientos que conformaron el consorcio bacteriano pertenezcan al mismo medio de cultivo con el fin de simplificar los ensayos subsecuentes.

Tabla 7. Selección de los aislamientos que conformaron el consorcio bacteriano. Los casilleros sombreados de amarillo señalan la concentración más elevada de cada metal a la cual los aislamientos pudieron tolerar. Los casilleros sombreados de verde señalan las bacterias que conformaron el consorcio. El símbolo ✓ hace referencia a aquellos aislamientos que mostraron crecimiento y X aquellos que no mostraron crecimiento en alguna concentración del metal.

Código	Medio de cultivo	Mn			Zn			Ca		
		C1	C2	C3	C1	C2	C3	C1	C2	C3
		57.3 mg/L	114.7 mg/L	172.1 mg/L	86.4 mg/L	172.9 mg/L	259.4 mg/L	33.3 mg/L	66.6 mg/L	99.9 mg/L
A1P	R2A	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2A	R2A	✓	✓	X	✓	✓	✓	✓	✓	✓
A3.2	R2A	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
L1	LB	X	X	X	✓	✓	✓	X	X	X
LH	LB	X	X	X	✓	✓	✓	X	X	X
C2	CDX	X	X	X	✓	✓	✓	X	X	X
C3.3	CDX	✓	X	X	X	X	X	X	X	X
C4	CDX	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

4.1.4. Ensayo de bioadsorción

La capacidad de bioadsorción se determinó mediante la diferencia entre la concentración inicial (Co) y final (Cf) (**Apéndice 7**) de los metales disueltos en el medio tras la aplicación del consorcio, y los resultados se expresaron en porcentajes (ver sección 3.7.2).

Al finalizar el ensayo, las concentraciones finales de Ca, Zn y Mn fueron de 83,05 mg/L; 78,62 mg/ y 0,01 mg/L respectivamente. En la **Figura 7**, se observa el porcentaje de bioadsorción de metales por el consorcio bacteriano. En cuanto al pH, se observó una variación mayor a 3 puntos (de 4,0 a 7,5) así como turbidez y formación de biopelículas al finalizar el ensayo (día 30) (**Apéndice 8**).

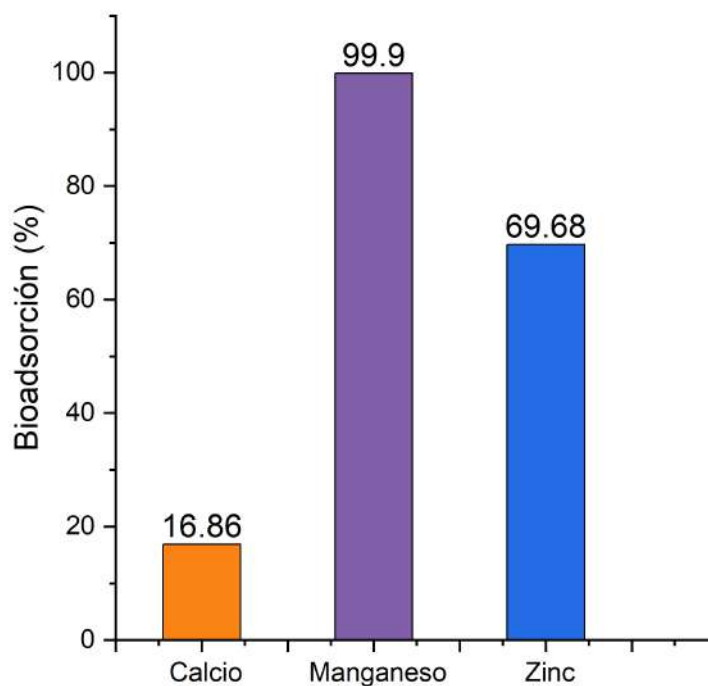


Figura 7. Porcentaje de bioadsorción de Ca, Mn y Zn por el consorcio bacteriano.

4.1.5. Análisis estadísticos

Se realizó el análisis de normalidad con la prueba de Shapiro Wilk, donde el valor de p fue menor a 0,05; es decir que los datos de los análisis de metales disueltos no siguen una distribución normal, para lo cual se realizó un análisis de pruebas no paramétricas. Es por ello que se realizó el análisis estadístico con Friedman con un nivel de confianza de 95% y un $p < 0.05$ y se determinó que no hay diferencias significativas entre los tres metales, Mn, Zn y Ca (**Apéndice 9**).

4.2. Discusión

4.2.1. Parámetros fisicoquímicos de los puntos de muestreo

Los parámetros fisicoquímicos del sedimento del túnel minero del cual se extrajeron las muestras tuvieron valores de pH de 3.1 a 3.2, además se encontró metales tales como Zn, Mn y Ca, estos resultados coinciden con los ambientes relacionados a la minería que se caracterizan por tener un bajo pH y altas concentraciones de metales cuyos valores llegan a superar los estándares de calidad ambiental (ECA) del agua establecidos por el MINAM (Aduvire, 2023). Elementos tales como Mn y Zn suelen encontrarse en intervalos de hasta más de 200 mg/L, mientras que el Ca puede llegar a encontrarse hasta 30 000 mg/L (Baldeon, 2022). Los valores de este estudio se asemejan a los resultados de Parades-Aguilar *et al.*, 2024, que caracterizaron dos túneles mineros en México, y presentaron pH ácidos (2,5 y 3,7) y concentraciones de 269,4 mg/L de Cu, 18 640 mg/L de Fe, 8981 mg/L de Pb; 53,7 mg/L de Cd y 6049 mg/L de Zn. Así también, Moreno *et al.*, 2024, caracterizaron un sitio minero en Perú cuyos valores de pH oscilaron entre 2,3 – 5,8 y contenían metales como Cu (154 – 479 mg/L), Al (38 – 241 mg/L), Zn (8,98 – 111 mg/L), Fe (42,7 – 911 mg/L) y Mg (57,4 – 231 mg/L). A pesar de estas condiciones, existen comunidades microbianas que prosperan en estos entornos extremos para la vida tales como microorganismos acidófilos ($\text{pH} < 5$) y metalo-tolerantes que crecen a una concentración > 1 mM del metal, los cuales contribuyen en los diferentes ciclos biogeoquímicos en estos ambientes (Baker y Banfield, 2003). Así también, las aplicaciones biotecnológicas de estos organismos son de interés hoy en día ya que podrían ser empleados en procesos de biolixiviación y/o biorremediación (Firincă *et al.*, 2024).

4.2.2. Características microbiológicas de los aislamientos bacterianos

Los aislamientos bacterianos presentaron diferentes morfologías macroscópicas (coloniales) y microscópicas tal como se observa en la **Tabla 6**. El empleo de diferentes medios de cultivo permitió la búsqueda de diferentes grupos microbianos: heterótrofos (LB), oligótrofos (R2A) y actinomicetos (CDX).

La obtención de un mayor número de aislamiento en el medio R2A (oligótrofos) tiene relación con las características del sitio de muestreo. Además, de las altas concentraciones de metales y un bajo pH, estos ambientes también se caracterizan por presentar bajas concentración de materia orgánica lo que limita el desarrollo de ciertos grupos microbianos (p.e., heterótrofos), creando condiciones para otros (p.e. oligótrofos). Así pues, el crecimiento de microorganismos oligótrofos puede ser promovido al emplear un medio de cultivo con bajas concentraciones de nutrientes tal como el R2A (Reasoner, 2004). En cuanto a los microorganismos que lograron crecer en el medio CDX (potenciales actinomicetos), su crecimiento estuvo influenciado por la presencia de la sacarosa (fuente de carbono) y nitrato de sodio (fuente de nitrógeno) en el medio de cultivo (Salazar y Ordóñez, 2013). La presencia de actinomicetos en entornos mineros ha sido reportando previamente en Soraia *et al.*, (2015), que llegaron aislar hasta 59 cepas de actinomicetos. Por otro lado, el menor número de bacterias heterótrofas aisladas en el medio LB podría estar influenciada por presencia de fuentes de materia orgánica complejas halladas en el túnel (madera y excremento de murciélago), las cuales tienden a ser degradadas de forma lenta limitando el crecimiento de grupos microbianos tales como heterótrofos (Méndez *et al.*, 2015).

En cuanto a las características microscópicas de los aislamientos, los resultados concuerdan con estudios previos que indican que las bacterias Gram positivas son predominantes en lugares contaminados con metales debido a su pared celular gruesa, formación de esporas y mecanismos de tolerancia a metales (Solano, (2021), Martínez *et al.*, (2010) y Martínez *et al.*, (2006)). En contraste, otros estudios como el realizado por Saleh, Rashed y Muhammed (2021) y Rodarte, (2017), reportaron el hallazgo de un igual número de bacterias Gram positivas como Negativas. Es importante mencionar que las bacterias Gram Negativas podrían presentar una mayor tolerancia a la toxicidad de metales en comparación a las Gram positivas debido a su compleja estructura de su pared celular (presencia de EPS) que les permitiría inmovilizar los metales de manera más eficiente (Bautista, 2008). Esto fue contrastado en nuestro estudio pues 2 aislamientos Gram negativos (A1P y 2A) toleraron las más altas concentraciones (259,4 mg/L; 172,1 mg/L y 99 mg/L) de los metales evaluados.

En cuanto a la producción de sideróforos (**Tabla 6**), sólo el aislamiento C3.3 (Gram +) fue el que produjo un cambio de coloración en el medio O – CAS, lo que indica que esta bacteria es capaz de producir sideróforos. Los sideróforos son moléculas que “atrapan” y movilizan el ión Fe^{+3} haciéndolo más disponible para los microorganismos en entornos donde el elemento está en una baja concentración (Schalk, Hannauer y Braud, 2011). Thiem *et al.*, (2018), señala que los sideróforos pueden disminuir la acumulación de metales pesados en las células bacterianas al secuestrar metales en el ambiente impidiendo la entrada al citoplasma.

En el caso del aislamiento C3.3, solo toleró la menor concentración de Mn (C1: 57,3 mg/L) no creciendo en las concentraciones de los demás metales evaluados. En el estudio

de Thiem *et al.*, (2018), reportan que *Pseudomona fulva*, produjo sideróforos en un medio suplementado con 2 diferentes concentraciones de Cd (0,5 – 1 mM), sin embargo cuando fue sometida a una concentración mayor (2 mM) de este metal, *P. fulva* dio negativo a la producción de sideróforos e inhibió su crecimiento. Esto puede suceder debido a que no todos los sideróforos producidos por los microorganismos pueden tener afinidad con todos los metales (Cd, Al, Zn, Mn, Co, Ni, etc) llegando a inhibir el crecimiento microbiano en diferentes concentraciones debido a su toxicidad (Thiem *et al.*, 2018). De cualquier forma, la producción de sideróforos por parte de microorganismos acidófilos podrían proporcionar una protección extracelular ya que estos metabolitos pueden secuestrar el metal fuera de la bacteria, evitando la toxicidad y la difusión intracelular (Ahmed y Holmström, 2014).

4.2.3. Tolerancia a metales de los aislamientos bacterianos

Se determinó la tolerancia de los aislados bacterianos a Ca (hasta 99,9 mg/L), Zn (hasta 259 mg/L) y Mn (hasta 172,1 mg/L) (**Figura 4, 5 y 6**). Los aislamientos A1P, 2A y A3.2 lograron tolerar las concentraciones más altas de los metales en estudio. Estos resultados coinciden con estudios previos en donde se reporta que aislamientos autóctonos de suelos contaminados con metales tienen la capacidad de tolerar metales en sus microambientes. Por ejemplo, Mihdhir y Assaedi, (2016) demostraron que cepas Gram positivas y negativas mostraron una tolerancia hasta 300 mg/L de Zn, 250 mg/L de Cd y 350 mg/L de Co durante un periodo de 72 h a 35 °C. Barboza *et al.*, (2017), aislaron bacterias provenientes de aguas de minas cuyos aislamientos toleraron las concentraciones desde 140 hasta 1200 mg/L de Mn a 28 °C por 7 días. Así también, Firincă *et al.*, (2024), aislaron bacterias tolerantes a Zn y también a otros metales como Cr y Pb, donde las bacterias toleraron hasta 800 mg/L de Zn, Cr y Pb por 72 h. De igual manera, Solano,

(2021), obtuvo 9 aislamientos provenientes de relaves mineros, siendo 8 aislamientos los que toleraron una concentración hasta 40 mg/L de Zn, Pb y As por 72 h a 37 °C.

Sin embargo, en el caso de las cepas LH, L1 y C2 las cepas no lograron crecer en ninguna concentración de Mn, y C3.3, LH, L1 y C2 no toleraron las concentraciones de Ca. Puede ser que una de las razones sea la toxicidad de los metales que causaron muerte celular a estos aislamientos que probablemente alteraron su morfología, metabolismo y crecimiento de los mismos (Medfu Tarekegn, Zewdu Salilih y Ishetu, 2020). En el estudio de Bautista, (2008), reportaron algo similar, algunos de los microorganismos que obtuvieron no lograron crecer a bajas concentraciones de Cu, Zn, Pb y Ni e inclusive en el medio sin metal, indicando que la tolerancia puede estar también en función al tiempo de contacto y no solo de la concentración, si se supera este tiempo puede ser probable que los mecanismos de tolerancia ya no sean suficientes. En los resultados de Ballardo, Merino and Gutiérrez, (2015) y Rodrigues *et al.*, (2022), el tiempo de contacto jugó un papel importante debido a que la tolerancia de estas bacterias en un tiempo corto (10 – 180 minutos) permitió que además de tolerar metales como Mn (50 mg/L), Co (50 mg/L), Cd (800 mg/L) y Pb (16 000 mg/L) tuvieran un porcentaje de adsorción cercano al 80%.

La tolerancia bacteriana depende de los mecanismos pasivos y activos como la captura o expulsión del metal, y la previa exposición a la contaminación por metales determina el aumento de la tolerancia así como el predominio especies adaptadas (Firincă *et al.*, 2024). Microorganismos con este tipo de mecanismos de tolerancia a metales, elevan su adaptabilidad y supervivencia en ambientes hostiles, siendo esto de interés para futuros estudios relacionados a abordar problemas ambientales con contaminación de metales.

4.2.4. Bioadsorción de metales por el consorcio bacteriano

La evaluación de la bioadsorción de metales por el consorcio alcanzó hasta un 99,99 %; 69,68 % y 16,86 % para Mn, Zn y Ca respectivamente. Así también, durante el ensayo el pH se elevó de 4 a 7,5. La bioadsorción de metales a la adherencia de iones o moléculas sobre la superficie del material biológico suspendidos en una solución líquida (Fomina y Gadd, 2014). Los resultados muestran que la bioadsorción del consorcio fue más eficiente para Mn y Zn reduciendo más del 50 % de sus concentraciones en comparación con el Ca. Es probable que exista una saturación de los sitios de unión de la superficie bacteriana por parte de los metales o una competencia de los mismos por los sitios de unión (Huang *et al.*, 2018).

Investigaciones previas han demostrado una relación directamente proporcional entre la remoción de metales y el incremento de pH. En el estudio de Huang *et al.*, 2023, el experimento a pH 3 con *Serratia marcescens* presentó un porcentaje de remoción de 4,14 % de Mn y a medida que este incrementaba (pH 5) la remoción de Mn aumentó hasta 90 %. Así también, en la investigación de Malkoc, Kaynak y Guven, (2016), la bacteria *Arthrobacter viscosus* obtuvo una remoción de Zn de hasta 89,4 % a pH 7 con un tiempo de óptimo de contacto de 1 h, diferente al 15 % que obtuvo a pH 4. Esto se explica debido a que la adsorción estuvo controlada por atracción iónica la cual aumenta al elevarse el pH. Bajo estas condiciones de pH (5 - 7) la superficie celular se carga negativamente creando sitios de adjunción para los iones metálicos que tienen carga positiva (Malkoc, Kaynak y Guven, 2016). El pH influye en la bioadsorción según el tipo de metal, pH de 5 a 7 los metales como Cu, Co, Zn y Mn se adjuntan a las bacterias, mientras que a pH menor a 3 los iones de H^+ compiten por los sitios de adsorción liberando los metales (Medfu Tarekegn, Zewdu Salilih y Ishetu, 2020).

La presencia de moléculas externas tales como los EPS también influye en los procesos de bioadsorción de metales. Las características morfológicas de los microorganismos empleados (Gram negativas) en el ensayo de bioadsorción estuvo influenciado en la remoción de Mn, Zn y Ca debido a los grupos funcionales (carboxilo, hidroxilo, amino, fosfatos, etc) presentes en los EPS, los cuales aumenta la afinidad hacia los iones metálicos evitando su ingreso al interior de la célula (Wróbel *et al.*, 2023). En este estudio la presencia de EPS se observó por la formación de biopelículas en las paredes de las botellas del ensayo de bioadsorción que aumentaban conforme transcurrían los días (**Apéndice 8**). Sin embargo la identificación de los mismos no se realizó, lo que abriría a nuevas posibilidades de seguir investigando.

Los exopolisacáridos (EPS) son excretados cuando hay cambios ambientales como por ejemplo ante la presencia de metales, forman biopelículas para la protección de células bacterianas inmovilizando los iones metálicos. La capacidad de bioadsorción por parte de los EPS es selectiva y depende de la estructura y cantidad de los grupos funcionales, pH, temperatura y concentración inicial del metal. La unión ocurre mediante las interacciones electrostáticas entre la carga de las biomoléculas (grupos funcionales) y los iones metálicos formando un complejo metal – EPS, y una vez inmovilizados pueden ser secuestrados y transformados por enzimas o proteínas mediante el intercambio iónico y formar de complejos (Presentato *et al.*, 2020).

El pH en este mecanismo también se debe tener en cuenta ya que a pH ácido (2 - 3) los iones metálicos (Pb, Cu, Cr, Co, etc) podrían competir con los iones H^+ por los mismos grupos funcionales del EPS, siendo el pH entre 5 y 6 la condición óptima para la bioadsorción por EPS (Presentato *et al.*, 2020). Por ejemplo en el estudio de Mwandira *et*

al., (2020), la cepa *Oceanobacillus profundus*, aislada de una mina abandonada, mostró que los EPS lograron adsorber un 87 % de Pb y Zn mientras que otras partes como la pared celular y citoplasma adsorbieron solo entre el 1 – 10 % de metales siendo el pH óptimo 4 porque observaron que el porcentaje de bioadsorción aumentó a un 50 % a partir de este valor.

Los resultados de esta investigación muestran que el consorcio conformado por los aislamientos bacterianos obtenidos de un túnel minero localizado en el distrito de Hualgayoc – Cajamarca que toleraron concentraciones de Zn, Mn y Ca, de hasta 259,4 mg/L; 172,1 mg/L y 99,9 mg/L son capaces de remover/bioadsorber estos metales bajo condiciones ácidas (pH 4). De esta manera, las bacterias que presentan mecanismos de bioadsorción como la adhesión física, complejación, intercambio iónico o producción de sideróforos pueden ser utilizados en procesos en la remediación de ambientes impactados por la minería que tienen un pH ácido brindando oportunidades de elaborar tecnologías con costos reducidos y sin impactos al ambiente. Además brindaría la oportunidad de estudiar nuevos microorganismos acidófilos y sus mecanismos de tolerancia en lugares contaminados con metales.

Finalmente se contrastó la hipótesis, el porcentaje de bioadsorción de metales por bacterias aisladas de sedimento se encuentra en el rango del 20 % al 70 %.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

Se aislaron 8 bacterias acidófilas moderadas (6 Gram positivas y 2 Gram negativas) provenientes de los sedimentos del túnel minero ubicado en el distrito de Hualgayoc, Cajamarca. Los aislamientos A1P, 2A y A3.2 se obtuvieron del medio de cultivo R2A, LH y L1 del medio LB y C2, C3.3. y C4 del medio CDX.

Los aislados A1P, 2A y A3.2 demostraron tolerancia a las concentraciones más altas de Mn (172,1 mg/L), Zn (259,4 mg/L) y Ca (99,9 mg/L). Estos aislamientos conformaron un consorcio bacteriano que fue luego empleado para el ensayo de bioadsorción de Mn, Zn y Ca.

La bioadsorción de Mn, Zn y Ca por el consorcio bacteriano (A1P, 2A, A3.2) fue de 99,99 %; 69,68 % y 16,86 % respectivamente, durante un periodo de 30 días a 30 °C y pH 4.

5.2. Recomendaciones

Esta investigación brinda las bases para futuros estudios relacionados a bacterias acidófilas moderadas, destacando el potencial biotecnológico de consorcios y ser aplicados en procesos de biorremediación de ambientes contaminados con metales pesados.

Utilizar otros tipos de medios de cultivos con menos componentes complejos como el medio mínimo de sales (MSM) o medio Tris mínimo, que sean viables para el estudio de las interacciones bacterias – metales. Esto ayudaría a evitar la precipitación de las sales metálicas en los medios de cultivos.

Así mismo, realizar otros tipos de análisis para verificar el lugar exacto de unión de los metales en la estructura de la pared celular. Análisis como microscopía electrónica de barrido (SEM - EDS) o espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), podría dar a conocer mejor el metabolismo de las bacterias ante los diferentes metales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aduvire, O. (2018) 'Dimensionado De Sistemas De Tratamiento De Aguas Acidas De Mina', *Scielo*, 2, pp. 1–11.

Aduvire, O. (2023) 'Gestión ambiental en minería: Certificaciones para iniciar y finalizar la actividad minera', *Revista de Medio Ambiente Minero y Minería*, 8(1), pp. 32–41. Available at: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2519-53522023000100004.

Ahmed, E. and Holmström, S. J. M. (2014) 'Siderophores in environmental research: Roles and applications', *Microbial Biotechnology*, 7(3), pp. 196–208. doi: 10.1111/1751-7915.12117.

Ali Redha, A. (2020) 'Removal of heavy metals from aqueous media by biosorption', *Arab Journal of Basic and Applied Sciences*. Taylor & Francis, 27(1), pp. 183–193. doi: 10.1080/25765299.2020.1756177.

Baker, B. J. and Banfield, J. F. (2003) 'Microbial communities in acid mine drainage', *FEMS Microbiology Ecology*, 44(2), pp. 139–152. doi: 10.1016/S0168-6496(03)00028-X.

Baldeon, A. (2022) *Efecto de la neutralización-precipitación química empleando hipoclorito de sodio y óxido de calcio, en la remoción de metales pesados en las aguas acidas del pasivo ambiental Quiulacocha, distrito de Simón Bolívar, Pasco 2021*.

Ballardo, C., Merino, F. and Gutiérrez, S. (2015) 'Evaluación de la capacidad de bioadsorción de Cadmio (II) y Plomo (II) mediante el uso de biomasa bacteriana muerta en soluciones acuosas', *Theorēma*, 2(2), pp. 95–106.

Barboza, N. R. *et al.* (2017) 'High manganese tolerance and biooxidation ability of *Serratia marcescens* Isolated from manganese mine Water in Minas Gerais, Brazil', *Frontiers in Microbiology*, 8(OCT), pp. 1–11. doi: 10.3389/fmicb.2017.01946.

Barrie Johnson, D. and Aguilera, A. (2019) 'Extremophiles and acidic environments', *Encyclopedia of Microbiology*, pp. 206–227. doi: 10.1016/B978-0-12-809633-8.90687-3.

Bashir, A. *et al.* (2019) 'Removal of heavy metal ions from aqueous system by ion-exchange and biosorption methods', *Environmental Chemistry Letters*. Springer International Publishing, 17(2), pp. 729–754. doi: 10.1007/s10311-018-00828-y.

Bautista, D. (2008) *Bioadsorción de metales pesados mediante el uso de biomasa bacteriana aislada de jales mineros*.

Cabrera, V. (2017) *Estudios de geomicrobiología y geoquímica microbiana en regolitos de los montes Ellsworth, Antártica*.

Castillo, L. *et al.* (2021) 'Pasivos ambientales mineros en el Perú', *Contraloría General de la República del Perú (CGR)*, I, p. 52.

Caviedes, D. *et al.* (2015) 'Tratamientos para la Remoción de Metales Pesados Comúnmente Presentes en Aguas Residuales Industriales. Una Revisión', *Ingeniería y Región*, p. 73. doi: 10.25054/22161325.710.

Chaparro, L. (2015) 'Drenajes ácidos de mina formación y manejo', *Revista ESAICA*, 1(1), p. 53. doi: 10.15649/24225126.272.

Covarrubias, S. and Peña, J. (2017) 'Contaminación ambiental por metales pesados en México: Problemática y estrategias de fitorremediación', *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*, 33, pp. 7–21. doi: 10.20937/RICA.2017.33.esp01.01.

Dopson, M. and Holmes, D. S. (2014) 'Metal resistance in acidophilic microorganisms and its significance for biotechnologies', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(19), pp. 8133–8144. doi: 10.1007/s00253-014-5982-2.

Firincă, C. *et al.* (2024) 'Microbial removal of heavy metals from contaminated environments using metal-resistant indigenous strains', *Journal of Xenobiotics*, 14(1), pp.

51–78. doi: 10.3390/jox14010004.

Fomina, M. and Gadd, G. M. (2014) ‘Biosorption: Current perspectives on concept, definition and application’, *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 160, pp. 3–14. doi: 10.1016/j.biortech.2013.12.102.

Forteza Guillot, M. (2020) *Capacidad de captación y resistencia a metales pesados de cepas seleccionadas de bacterias lácticas*.

Gadd, G. (2009) ‘Biosorption: Critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment’, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 84(1), pp. 13–28. doi: 10.1002/jctb.1999.

Gaur, N. *et al.* (2014) ‘A review with recent advancements on bioremediation-based abolition of heavy metals’, *Environmental Sciences: Processes and Impacts*, 16(2), pp. 180–193. doi: 10.1039/c3em00491k.

Harischandra, D. S. *et al.* (2019) ‘Manganese-induced neurotoxicity: New insights into the triad of protein misfolding, mitochondrial impairment, and neuroinflammation’, *Frontiers in Neuroscience*, 13(JUN), pp. 1–19. doi: 10.3389/fnins.2019.00654.

Hesse, E. *et al.* (2018) ‘Ecological selection of siderophore-producing microbial taxa in response to heavy metal contamination’, *Ecology Letters*, 21(1), pp. 117–127. doi: 10.1111/ele.12878.

Huang, H. *et al.* (2018) ‘Biosorption characteristics of a highly Mn(II)resistant *Ralstonia pickettii* strain isolated from Mn ore’, *PLOS ONE*, 13(8), pp. 1–17. doi: 10.1371/journal.pone.0203285.

Huang, X. *et al.* (2023) ‘Efficient Mn(II) removal mechanism by *Serratia marcescens* QZB-1 at high manganese concentration’, *Frontiers in Microbiology*, 14(April), pp. 1–11. doi: 10.3389/fmicb.2023.1150849.

Johnson, K. J., Cygan, R. T. and Fein, J. B. (2006) ‘Molecular simulations of metal

adsorption to bacterial surfaces', *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 70(20), pp. 5075–5088. doi: 10.1016/j.gca.2006.07.028.

Li, J. *et al.* (2019) 'Advances in the mechanisms of plant tolerance to manganese toxicity', *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20). doi: 10.3390/ijms20205096.

Louden, B. C., Haarmann, D. and Lynne, A. M. (2011) 'Use of Blue Agar CAS Assay for Siderophore Detection', *Journal of Microbiology & Biology Education*, 12(1), pp. 51–53. doi: 10.1128/jmbe.v12i1.249.

Malkoc, S., Kaynak, E. and Guven, K. (2016) 'Biosorption of zinc(II) on dead and living biomass of *Variovorax paradoxus* and *Arthrobacter viscosus*', *Desalination and Water Treatment*, 57(33), pp. 15445–15454. doi: 10.1080/19443994.2015.1073181.

Martínez, A. *et al.* (2010) 'Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas del río Almendares', *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 41, pp. 1–10. Available at: <http://www.redalyc.org/pdf/1812/181220509038.pdf>.

Martinez, R. J. *et al.* (2006) 'Horizontal gene transfer of PIB-type ATPases among bacteria isolated from radionuclide- and metal-contaminated subsurface soils', *Applied and Environmental Microbiology*, 72(5), pp. 3111–3118. doi: 10.1128/AEM.72.5.3111-3118.2006.

Medfu Tarekegn, M., Zewdu Salilih, F. and Ishetu, A. I. (2020) 'Microbes used as a tool for bioremediation of heavy metal from the environment', *Cogent Food and Agriculture*. Cogent, 6(1). doi: 10.1080/23311932.2020.1783174.

Méndez, C. *et al.* (2015) 'Microbial diversity and metabolic networks in acid mine drainage habitats', *Frontiers in Microbiology*, 6(MAY), pp. 1–17. doi: 10.3389/fmicb.2015.00475.

Mihdhir, A. A. and Assaedi, A. S. (2016) 'Detection, Identification and Characterization of Some Heavy Metals Tolerant Bacteria', *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 8(3), pp. 2–7. doi: 10.4172/1948-5948.1000290.

MINAM (2017) ‘Aprueban Estandares de Calidad Ambiental (ECA) para Agua y establecen disposiciones complementarias’, *El Peruano*, pp. 6–9. Available at: <http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2017/06/DS-004-2017-MINAM.pdf>.

Moreno, C. W. G. *et al.* (2024) ‘Microbial Community with Potential for Metal Release Isolated from Palca Mine Tailings Pond in Peru’, *Journal of Geoscience and Environment Protection*, 12(07), pp. 109–121. doi: 10.4236/gep.2024.127007.

Murillo, M. (2023) *Procedimiento para determinar la concentración fitocelular de un cultivo mediante la utilización del instrumento biológico cámara de neubauer*.

Mwandira, W. *et al.* (2020) ‘Biosorption of Pb (II) and Zn (II) from aqueous solution by *Oceanobacillus profundus* isolated from an abandoned mine’, *Scientific Reports*. Nature Publishing Group UK, 10(1), pp. 1–9. doi: 10.1038/s41598-020-78187-4.

Parades-Aguilar, J. *et al.* (2024) ‘Isolation and identification of metallotolerant bacteria with a potential biotechnological application’, *Scientific Reports*. Nature Publishing Group UK, 14(1), pp. 1–12. doi: 10.1038/s41598-024-54090-0.

Patiño, J. (2022) *Sistema de tratamiento activo mediante neutralización con óxido de calcio en solución, para la remoción de concentraciones de hierro y aluminio del drenaje ácido de mina de la unidad minera Arasi, Ocuvi-Puno, 2019*. Available at: <https://repositorio.unac.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12952/7914/TESIS-RODAS.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

Pérez-Miranda, S. *et al.* (2007) ‘O-CAS, a fast and universal method for siderophore detection’, *Journal of Microbiological Methods*, 70(1), pp. 127–131. doi: 10.1016/j.mimet.2007.03.023.

Pérez, L. *et al.* (2018) ‘Biosorción microbiana de metales pesados: características del proceso’, *Cuban Journal of Biological Sciences*, 6(1), p. 13. Available at: <https://web.b.ebscohost.com/abstract?direct=true&profile=ehost&scope=site&authtype=crawler&jrnl=2307695X&AN=131575423&h=cWFAsxhnDzkU66ne0NeOWMUg2y>

%2FfJSp9ZEZ4o1JwXeqiEqR%2BGnn4AUo3qRx8Bt2Im8tSn790pc823DHeB2y1jw%3D%3D&crl=c&resultNs=AdminWebAuth&resultLoca.

Pham, V. H. T. *et al.* (2022) ‘Bacterial Biosorbents, an Efficient Heavy Metals Green Clean-Up Strategy: Prospects, Challenges, and Opportunities’, *Microorganisms*, 10(3), pp. 1–16. doi: 10.3390/microorganisms10030610.

Presentato, A. *et al.* (2020) ‘Processing of metals and metalloids by actinobacteria: Cell resistance mechanisms and synthesis of metal(loid)-based nanostructures’, *Microorganisms*, 8(12), pp. 1–37. doi: 10.3390/microorganisms8122027.

Rahman, Z., Thomas, L. and Singh, V. P. (2019) ‘Biosorption of heavy metals by a lead (Pb) resistant bacterium, *Staphylococcus hominis* strain AMB-2’, *Journal of Basic Microbiology*, 59(5), pp. 477–486. doi: 10.1002/jobm.201900024.

Reasoner, D. J. (2004) ‘Heterotrophic plate count methodology in the United States’, *International Journal of Food Microbiology*, 92(3), pp. 307–315. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2003.08.008.

Rodarte, L. (2017) *Bioprospección de microorganismos con resistencia a metales de sitios contaminados con arsénico*. Available at: <https://ipicyt.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1010/1630/1/TMIPICYTR6B52017.pdf>.

Rodrigues, A. *et al.* (2022) ‘Biosorción de Co(II) y Mn(II) en soluciones acuosas por la bacteria *Rhodococcus opacus*’, *Tecnología y Ciencias del Agua*, 13(4), pp. 225–275. doi: 10.24850/j-tyca-2022-04-05.

Salazar, A. and Ordóñez, C. (2013) *Aislamiento e identificación de Actinomicetos fijadores de nitrógeno en suelo del jardín botánico de la universidad tecnológica de Pereira*.

Saleh, L. I. F., Rashed, R. O. and Muhammed, S. M. (2021) ‘Evaluation of heavy metal content in water and removal of metals using native isolated bacterial strains’,

Biodiversitas, 22(8), pp. 3163–3174. doi: 10.13057/biodiv/d220810.

Schalk, I. J., Hannauer, M. and Braud, A. (2011) ‘New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance’, *Environmental Microbiology*, 13(11), pp. 2844–2854. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02556.x.

Schwyn, B. and Neilands, J. B. (1987) ‘Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores’, *Analytical Biochemistry*, 160(1), pp. 47–56. doi: 10.1016/0003-2697(87)90612-9.

Slavin, Y. N. *et al.* (2017) ‘Metal nanoparticles: Understanding the mechanisms behind antibacterial activity’, *Journal of Nanobiotechnology*. BioMed Central, 15(1), pp. 1–20. doi: 10.1186/s12951-017-0308-z.

Solano, F. (2021) *Análisis del comportamiento ante metales pesados en bacterias aisladas de relaves mineros zacatecanos*.

Soraia, E. B. *et al.* (2015) ‘Resistance to and accumulation of heavy metals by actinobacteria isolated from abandoned mining areas’, *Scientific World Journal*, 2015, pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.1155/2015/761834>.

Soto, J. (2010) ‘La dureza del agua como indicador básico de la presencia de incrustaciones en instalaciones domésticas sanitarias’, *Ingeniería, investigación y tecnología*, 11(2), pp. 167–177. doi: 10.22201/fi.25940732e.2010.11n2.014.

Thiem, D. *et al.* (2018) ‘Cadmium-induced changes in the production of siderophores by a plant growth promoting strain of *Pseudomonas fulva*’, *Journal of Basic Microbiology*, 58(7), pp. 623–632. doi: 10.1002/jobm.201800034.

Tovar Pacheco, J. (2003) ‘Vulnerabilidad del agua subterránea frente a la actividad minera y prevención de la generación de aguas ácidas de mina’, *Revista Latinoamericana de Hidrogeología*, pp. 99–109.

Trujillo Peralta, F. A. *et al.* (2023) ‘Bacterias tolerantes y resistentes a los metales pesados

en el ambiente', *Epistemos*, 17(35). doi: 10.36790/epistemos.v17i34.287.

Valdez-Nuñez, L. F. *et al.* (2024) 'Acidophilic sulphate-reducing bacteria: Diversity, ecophysiology, and applications', *Environmental microbiology reports*, 16(5), p. e70019. doi: 10.1111/1758-2229.70019.

Wróbel, M. *et al.* (2023) 'Bioremediation of Heavy Metals by the Genus *Bacillus*', *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(6). doi: 10.3390/ijerph20064964.

Yao, H. *et al.* (2023) 'Isolation and identification of mercury-tolerant bacteria LBA119 from molybdenum-lead mining soils and their removal of Hg²⁺', *Toxics*, 11(3). doi: 10.3390/toxics11030261.

Zamora, G. and Meza, R. (2022) 'Formación, prevención e innovación en el tratamiento de drenajes ácidos en operaciones mineras', *Medio ambiente minero y minería*, 11(1), pp. 3–21. Available at: http://www.scielo.org.bo/pdf/mamym/v7n1/v7n1_a01.pdf.

APÉNDICES

Apéndice 1. Puntos de muestreos PM1 y PM2



Figura 8. Puntos de muestreo donde se recolectaron las muestras de agua y sedimento en un túnel minero del distrito de Hualgayoc, Cajamarca.

Apéndice 2: Colección de muestras de sedimento en un túnel minero del distrito de Hualgayoc, Cajamarca



Apéndice 3: Solución stock de metales

En la **figura 9** se observa el proceso de la preparación de los stocks. Se utilizaron las siguientes sales: $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (845 mg), ZnSO_4 (1437.7 mg) y $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (735.05 mg). La concentración de cada stock de metal fue 10 veces mayor que las concentraciones que se utilizó en el ensayo de tolerancia. Se utilizó la siguiente fórmula para la preparar el stock:

$$m = M \times PM \times V$$

Donde:

m = masa

M = molaridad

PM = peso molecular

V = volumen



Figura 9. Esquema de la preparación de la solución stock de Mn, Zn y Mn.

Apéndice 4: Curva de calibración

Para determinar la curva de crecimiento de cada aislamiento se realizó diluciones seriadas, conteo celular y medición de turbidez (**figura 9**).

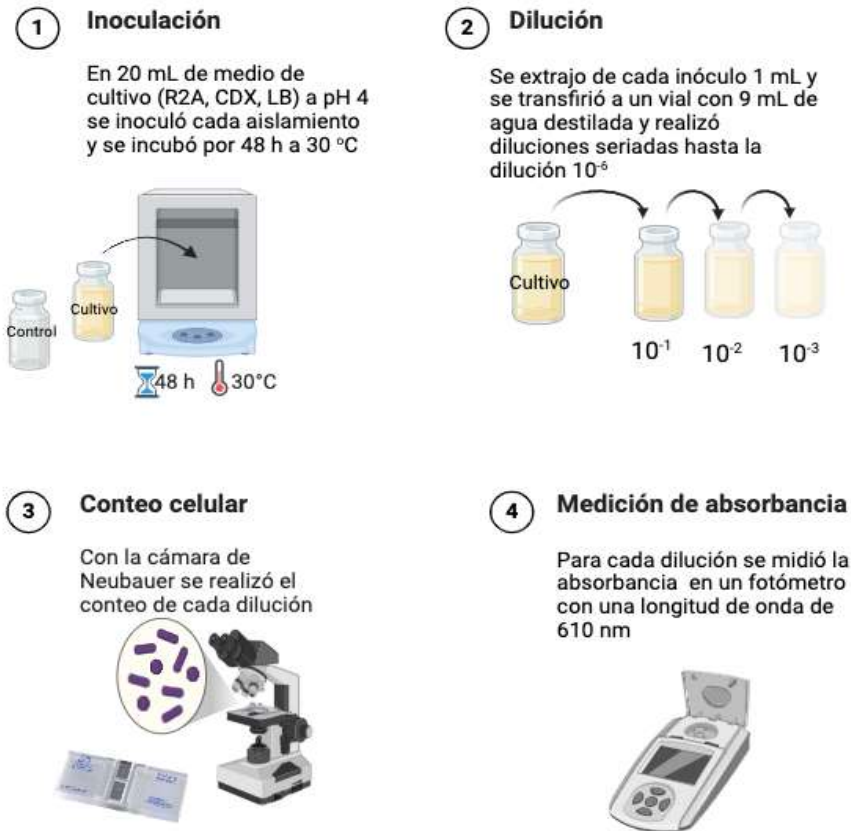


Figura 10. Esquema de la metodología de la curva de crecimiento.

Con la cámara de Neubaer se realizó el conteo de cada dilución extrayendo 20 μ L de cada uno. El conteo se realizó en los 4 cuadrantes del extremo y mediante la siguiente fórmula se halló el N° de células/mL (Murillo, 2023):

$$\frac{Cél}{mL} = \frac{N}{4} * 10^4$$

Donde:

N: Número total de células contadas en los 4 cuadrantes.

Así mismo, se utilizó un fotómetro (Spectroquant Move 100, Merck), para determinar la absorbancia de cada dilución. Se usó una longitud de onda de 610 nm donde el resultado se expresó en miliabsorbancia (mAbs) por lo que se tuvo que convertir a absorbancia (Abs). Con los datos obtenidos se obtuvo la curva de calibración de cada aislamiento (figura 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18).

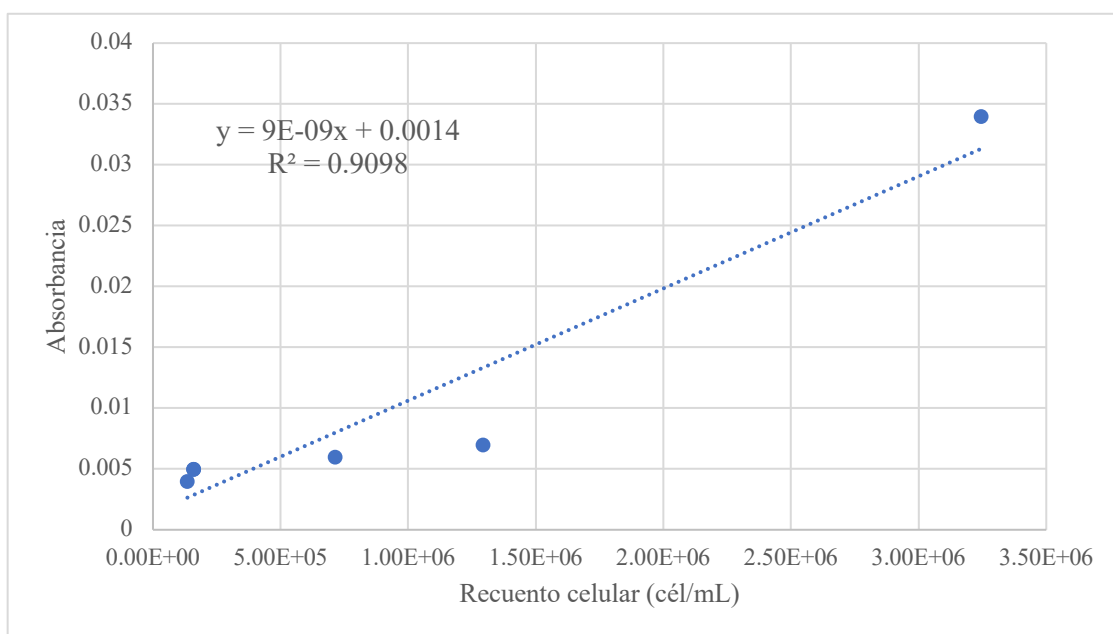


Figura 11. Curva de calibración del aislamiento AIP.

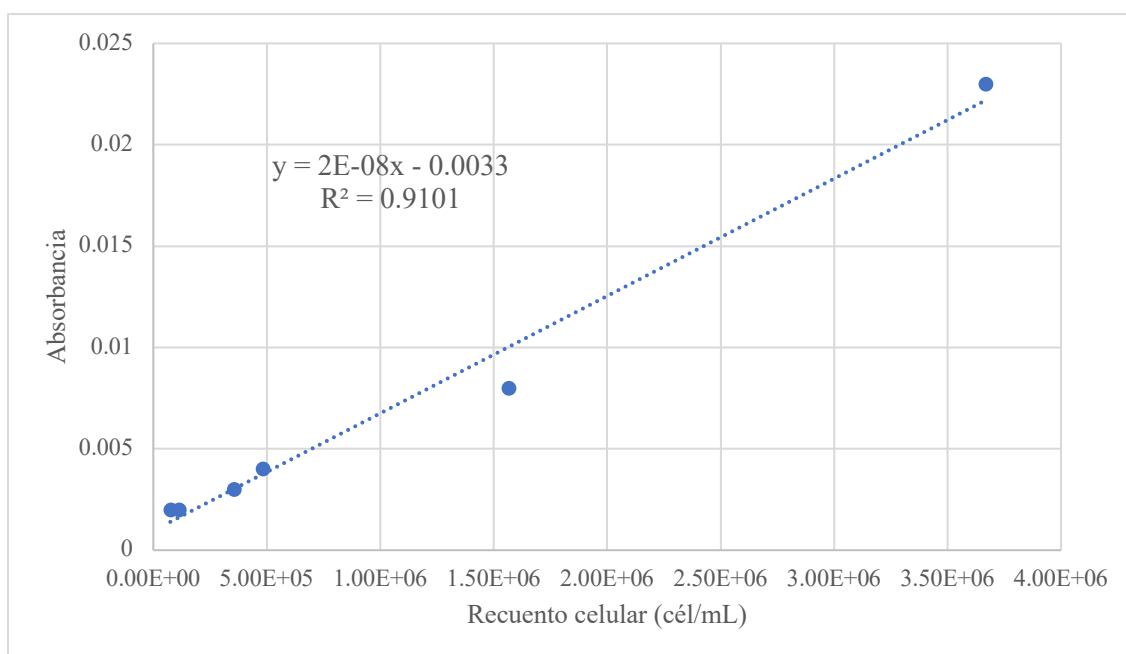


Figura 12. Curva de calibración del aislamiento 2A.

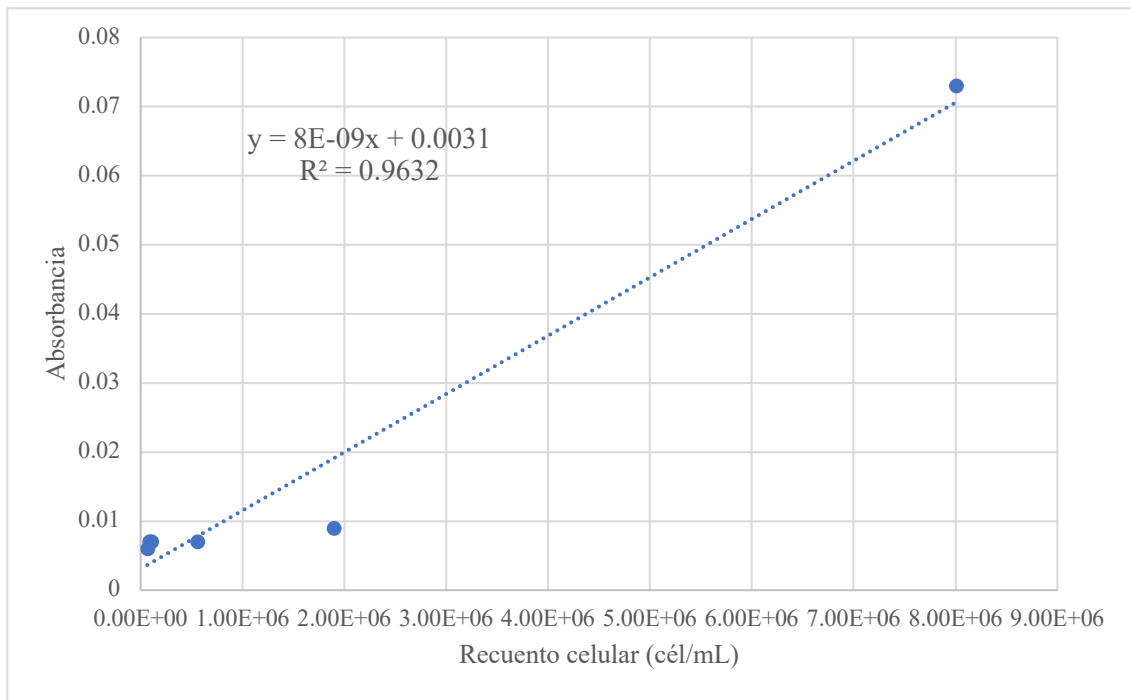


Figura 13. Curva de calibración del aislamiento A3.2.

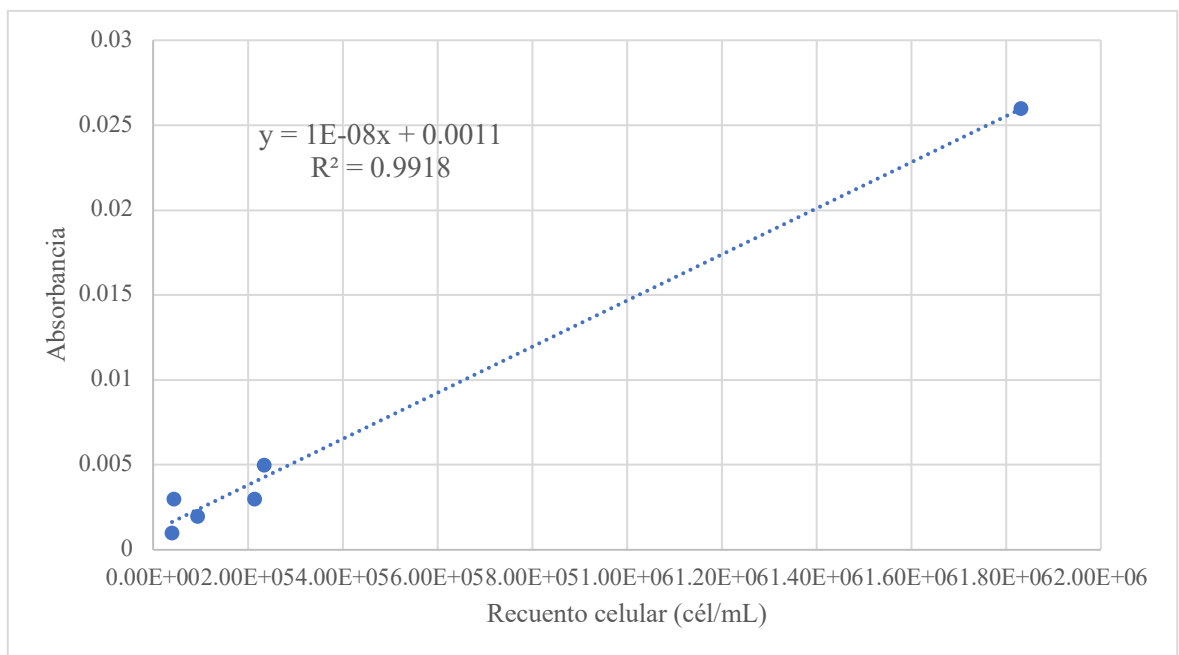


Figura 14. Curva de calibración del aislamiento L1

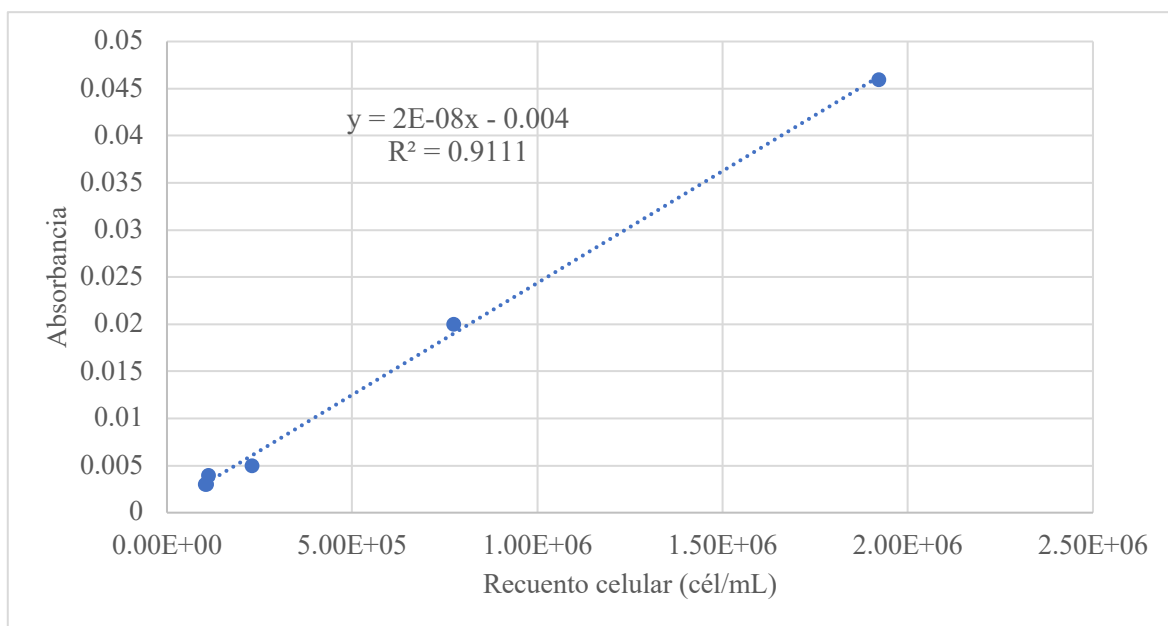


Figura 15. Curva de calibración del aislamiento LH

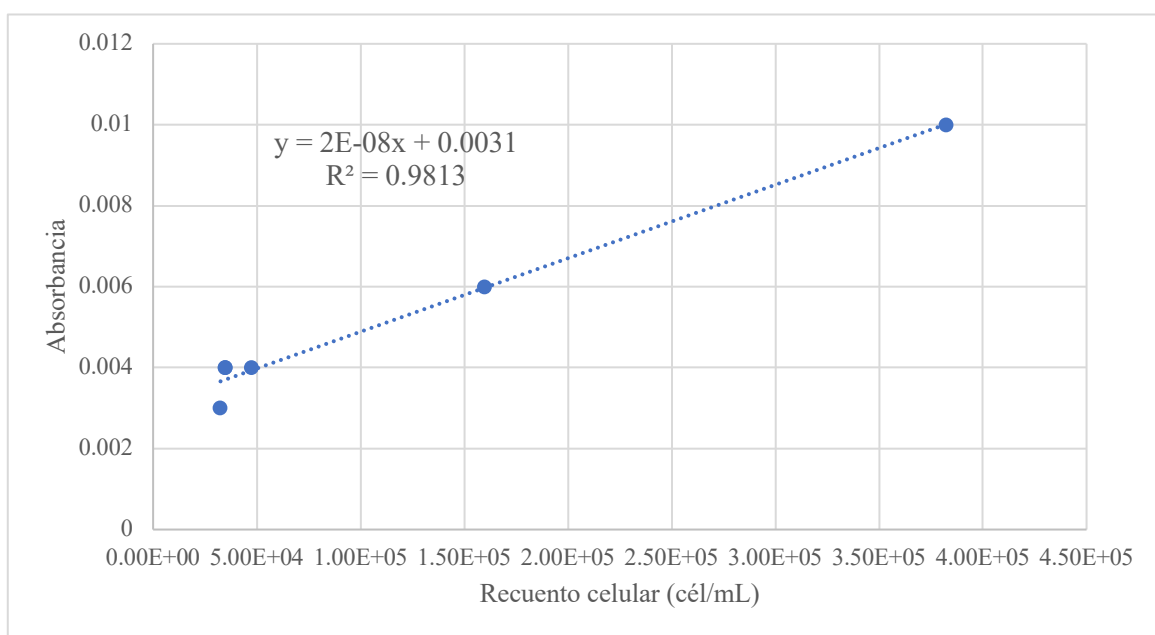


Figura 16. Curva de calibración del aislamiento C2

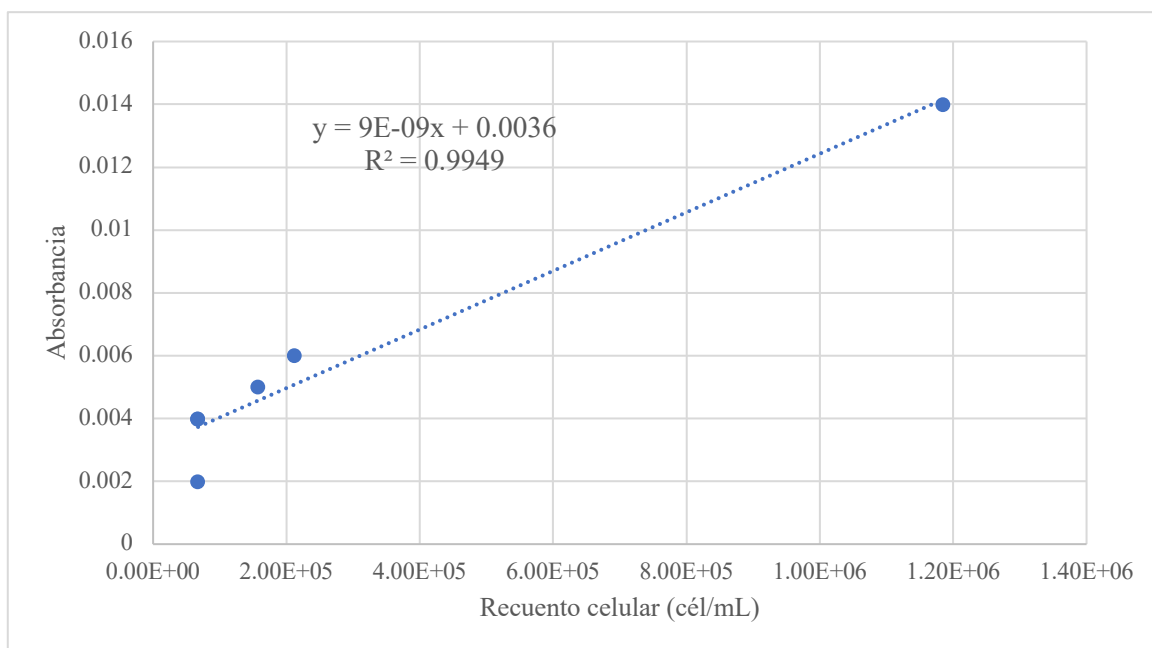


Figura 17. Curva de calibración del aislamiento C3.3

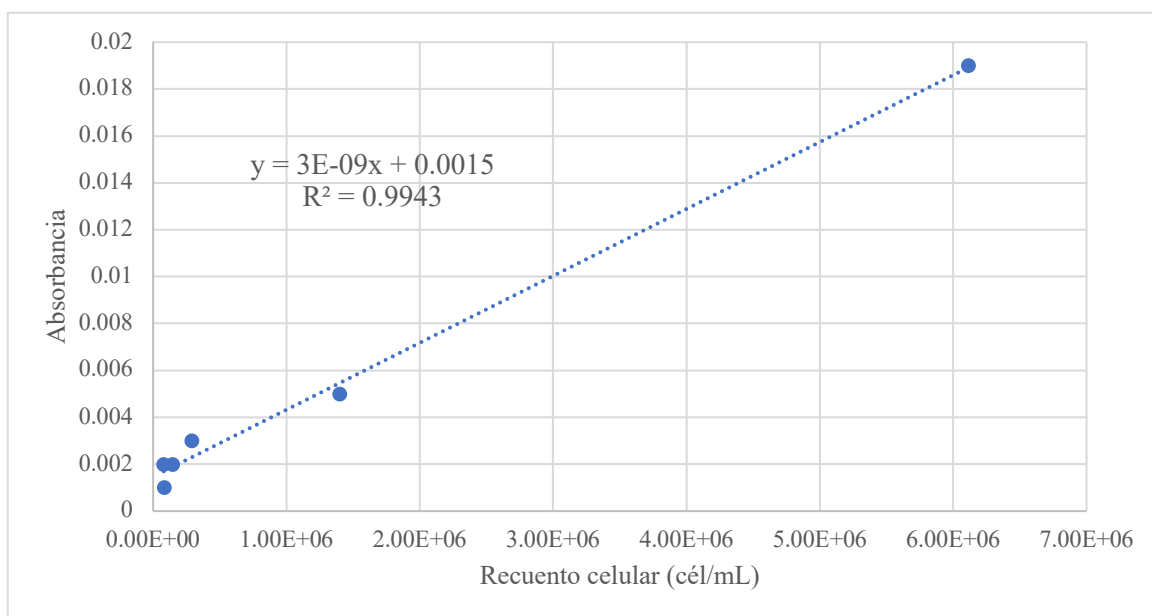


Figura 18. Curva de calibración del aislamiento C4

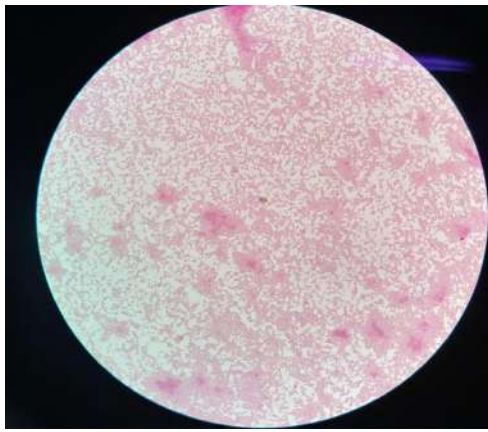
Con los datos de absorbancia y conteo celular se halló la ecuación que ayudó a hallar la concentración celular de cada aislamiento para su reactivación y utilizarlas como inóculo en el ensayo de tolerancia. Los datos obtenidos de la absorbancia de cada dilución se reemplazó en la ecuación de cada aislamiento para poder obtener la concentración celular

(**Tabla 8**), así mismo en la misma ecuación se reemplazó la absorbancia obtenida en el ensayo de tolerancia para hallar la concentración celular de cada aislamiento.

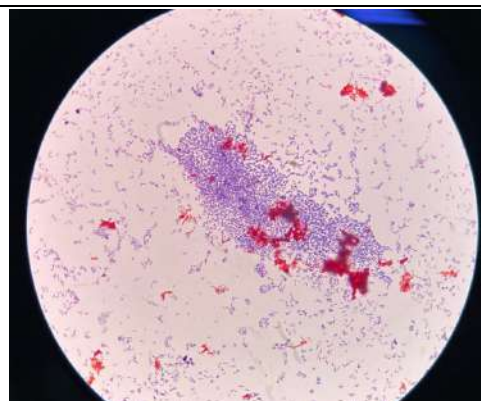
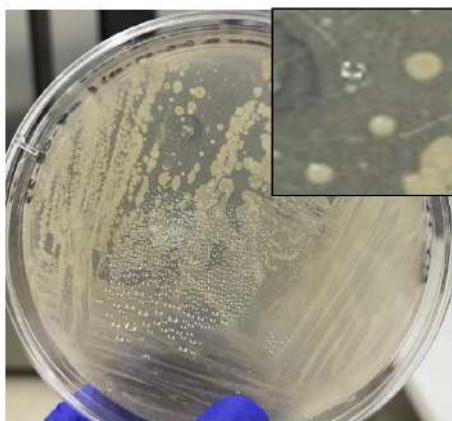
Tabla 8. Concentración celular de cada aislamiento que se utilizó en el ensayo de tolerancia

Aislamiento	Abs	Ecuación	Concentración celular
A1P	0.034	$x = (y - 0.0014) / 9 \times 10^{-9}$	1.16×10^6
2A	0.023	$x = (y + 0.0033) / 2 \times 10^{-8}$	1.32×10^6
A3.2	0.073	$x = (y - 0.0031) / 8 \times 10^{-9}$	8.74×10^6
L1	0.026	$x = (y - 0.0011) / 1 \times 10^{-8}$	2.49×10^6
LH	0.046	$x = (y + 0.004) / 2 \times 10^{-8}$	2×10^5
C2	0.01	$x = (y - 0.0031) / 2 \times 10^{-8}$	3.45×10^5
C3.3	0.014	$x = (y - 0.0036) / 9 \times 10^{-9}$	1.16×10^6
C4	0.019	$x = (y - 0.0015) / 3 \times 10^{-9}$	5.83×10^6

Apéndice 5: Resultados de la caracterización fenotípica de los aislados bacterianos

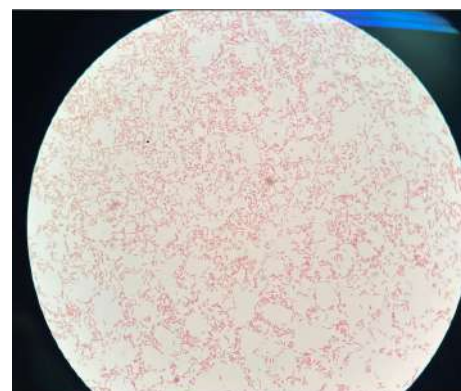
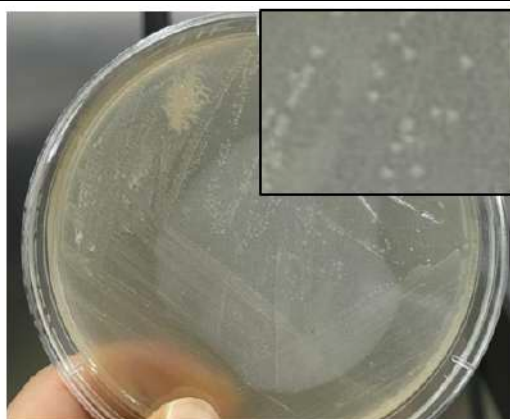
Aislados bacterianos	Aspecto de la colonia en placa petri	Tinción gram (observación 1000 X con microscopio óptico)
A1P		 1000 X

A3.2



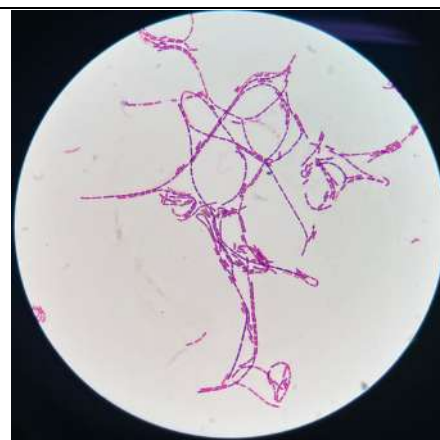
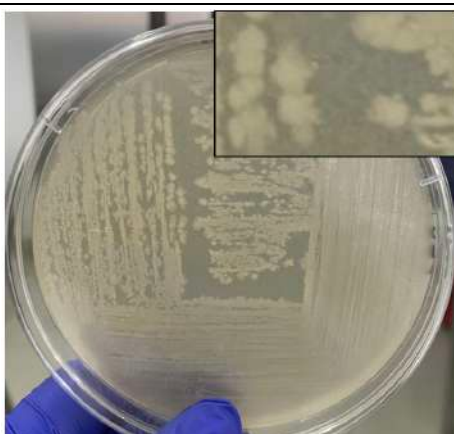
1000 X

2A



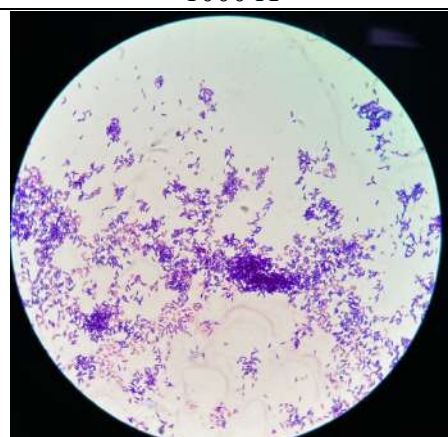
1000 X

C2



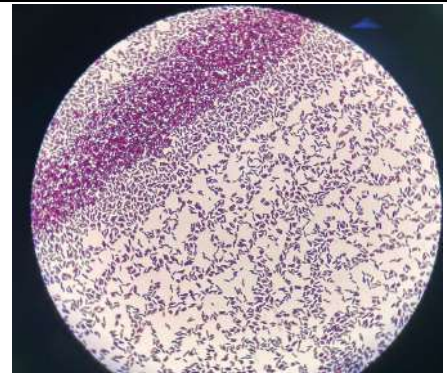
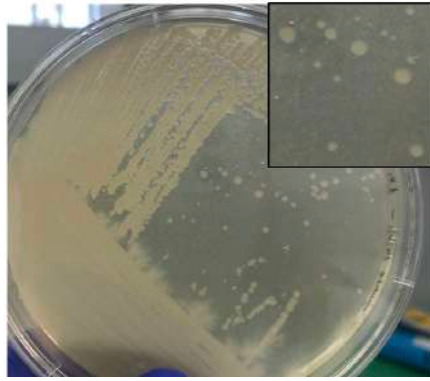
1000 X

C3.3



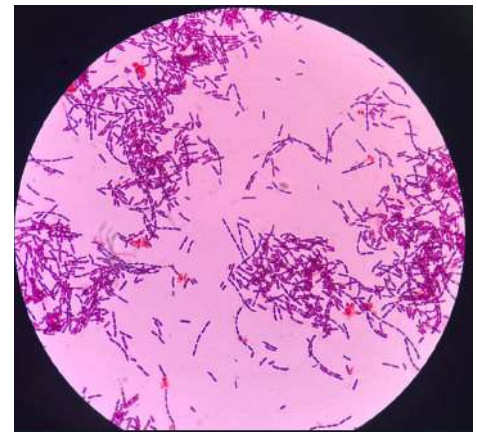
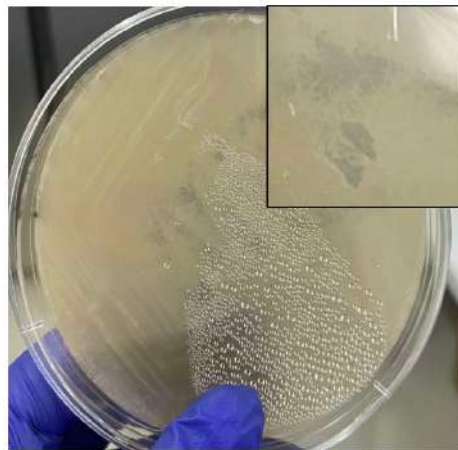
1000 X

L1



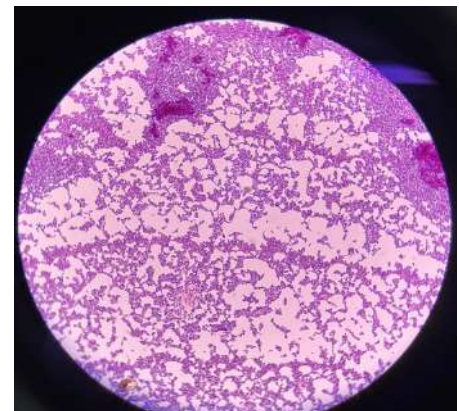
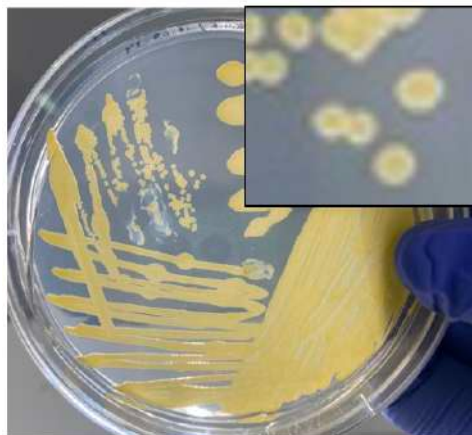
1000 X

LH



1000 X

C4



1000 X

Apéndice 6: Producción de sideróforos

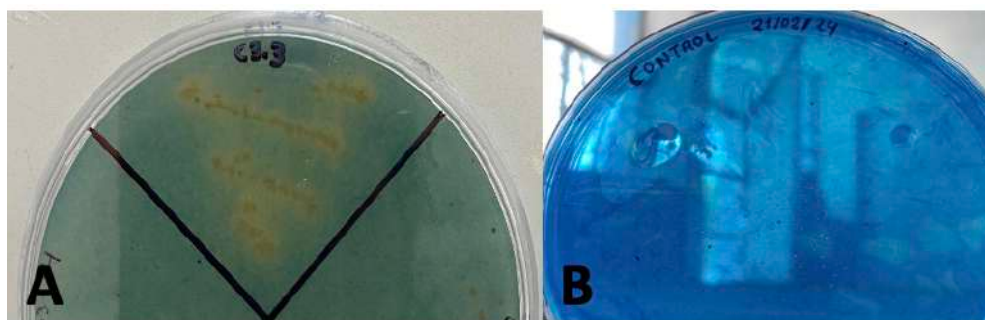


Figura 19. Resultados de la producción de sideróforos. **A)** Resultado positivo por la cepa C3.3 por el método O – CAS. **B)** Placa de control del medio CAS sin crecimiento.

Apéndice 7: Concentraciones de los metales Ca, Mn y Zn en el ensayo de bioadsorción

Bioadsorción del consorcio		
Metal	Ci (mg/L)	Cf (mg/L)
Ca	99,9	83,05
Mn	172,1	0,01
Zn	259,4	78,62

Concentración inicial (Ci); Concentración final (Cf)

Apéndice 8: Turbidez en el test de bioadsorción

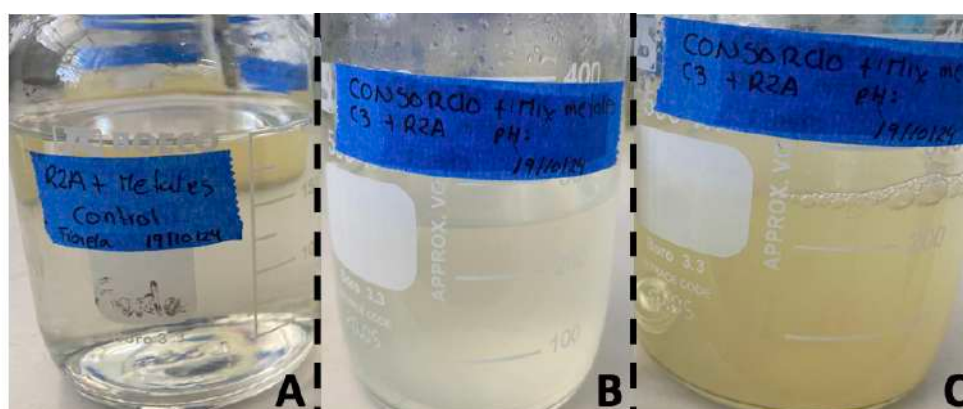


Figura 20. Crecimiento del consorcio bacteriano durante el ensayo de bioadsorción. El ensayo se realizó en el medio R2A inoculando el consorcio conformado por los aislamientos A1P, 2A, A3.2 a pH 4, incubados a 30 °C durante 30 días. **A)** Control del ensayo medio R2A + mix metales (Mn, Zn, Ca) sin inoculación del consorcio. **B)** Observación del crecimiento del consorcio a los 5 días de inoculación. **C)** Crecimiento del consorcio bacteriano a los 30 días.

Apéndice 9: Análisis estadístico con la prueba de Shapiro Wilk y Friedman

Prueba de normalidad

Shapiro-Wilk

	DF	Statistic	p-value	Decision at level(5%)
Valor	6	0.74532	0.01792	Reject normality

Valor: At the 0.05 level, the data was not significantly drawn from a normally distributed population.

Prueba de Friedman

Descriptive Statistics

	N	Min	Q1	Median	Q3	Max
1	3	0.01248	0.01248	80.147	97.0681	97.0681
2	3	0.01358	0.01358	82.006	95.5134	95.5134

Test Statistics

	Chi-Square	DF	Prob>Chi-Square
	0.33333	1	0.5637

Null Hypothesis: The samples come from the same population.

Alternative Hypothesis: The samples come from different populations.

At the 0.05 level, the populations are NOT significantly different

ANEXOS

Anexo 1: Composición de los medios de cultivo R2A, Luria Bertani y Czapek Dox

Cuadro 1. Composición del medio de cultivo R2A

R2A	
Formulación	g/L
Extracto de levadura	0,5
Proteosa peptona N°3	0,5
Sulfato magnésico anhidro	0,024
Glucosa	0,5
Almidón soluble	0,5
Piruvato de sodio	0,3
Fosfato dipotásico	0,3
Hidrolizado de caseína	0,5

Fuente: (Cabrera, 2017)

Cuadro 2. Composición del medio de cultivo Luria Bertani

LB	
Formulación	g/L
Peptona de caseína	10
Extracto de levadura	5
Cloruro de sodio (NaCl)	10

Fuente: (Cabrera, 2017)

Cuadro 3. Composición del medio de cultivo Czapek Dox

Czapek Dox	
Formulación	g/L
Sulfato ferroso	0,01
Sacarosa	30
Glicerofosfato magnésico	0,5
Cloruro potásico	0,5
Nitrato de sodio	3
Sulfato dipotásico	1

Fuente: (Yao *et al.*, 2023)

Anexo 2: Elaboración del medio de cultivo CAS

La elaboración del medio CAS tuvo como referencia a Schwyn y Neilands, (1987) y Loudon, Haarmann y Lynne, (2011).

A. Solución MM9

Se mezcló 0,15 g KH_2PO_4 ; 0,25 g NaCl ; 0,5 g NH_4Cl ; 0,12 g MgSO_4 ; 0,005 g CaCl_2 en 500 mL de agua destilada (pH 7). Luego se desferró la solución con 0,5 g de 8 – hidroxiquinoleína diluida en 5 mL de cloroformo. Se agitó a 150 rpm por 36 h a 4 °C. Se agregó 10 mL de cloroformo, se agitó a la misma velocidad y temperatura por 1 h y se recuperó la fase acuosa a un nuevo frasco. Esto se realizó dos veces hasta remover elementos traza de 8 – hidroxiquinoleína. Finalmente se calentó la solución final a 45 °C agitando por 10 min para eliminar el cloroformo residual.

B. Solución CAS – HDTMA

Solución 1: Se disolvió 0,060 g de CAS (Cromo azurol sulfatado) en 50 mL de agua destilada.

Solución 2: Se disolvió 0,027 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 100 mL de HCL 10 mM.

Solución 3: Se disolvió 0,073 g de HDTMA (bromuro de hexadiltrimetilamonio) en 40 mL de agua destilada.

Se mezcló la solución 1 con 10 mL de la solución 2 y se homogenizó. Luego se adicionó la solución 3 y se autoclavó a 121 °C por 20 min. El color de solución adquirió una coloración azul.

C. Solución stock de ácido casamino desferrado

Se disolvió 5 gr de ácido casamino en 50 mL de agua destilada, luego se desferró la solución utilizando 0,5 g de 8 – hidroxiquinoleína diluida en 5 mL de cloroformo agitando a 150 rpm por 36 h a 4 °C. Se agregó 10 mL de cloroformo, se agitó a la misma velocidad y temperatura por 1 h, y se recuperó la fase acuosa a un nuevo frasco. Esto se realizó dos veces hasta remover elementos traza de 8 – hidroxiquinoleína. Finalmente se calentó la solución final a 45 °C agitando por 10 min para eliminar el cloroformo residual.

D. Solución stock de NaOH 50 %

Se disolvió 50 g de NaOH en 100 mL de agua destilada.

E. Solución stock de glucosa 20 %

Se disolvió 10 g de glucosa en 50 mL de agua destilada.

Preparación del agar CAS

En 375 mL de agua destilada se agregó 8 mL de la solución stock de NaOH 50 %. Se disolvió 16,12 g de PIPES (piperazina-N, N'-bis (2-ácido etanosulfónico)) y se ajustó el pH a 6.8. Luego se adicionó 50 mL de la solución MM9 y 17 g de agarosa. Se autoclavó a 121 °C por 20 min. Una vez frío, con un filtro de jeringa se agregó 15 mL de la solución ácido casamino desferrado y 5 mL de la solución de glucosa 20 %. Finalmente de manera lenta se agregó la solución CAS – HDTMA por el costado del frasco para evitar la formación de burbujas.

**Anexo 3: Informe de los resultados del análisis de concentración de metales
disueltos otorgados por el laboratorio SGS – Perú, sede Cajamarca.**

IDENTIFICACIÓN DE MUESTRA					CSM1	CSM2
FECHA DE MUESTREO					26/11/2024	26/11/2024
HORA DE MUESTREO					11:00:00	11:00:00
CATEGORIA					AGUA RESIDUAL	AGUA RESIDUAL
SUB CATEGORIA					AGUA RESIDUAL	AGUA RESIDUAL
					INDUSTRIAL	INDUSTRIAL
Parámetro	Referencia	Unidad	LD	LC	Resultado ± Incertidumbre	Resultado ± Incertidumbre
Metales Disueltos						
Aluminio Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.001	0.003	0.027 ± 0.0020	0.056 ± 0.0050
Antimonio Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.00004	0.00013	<0.00013	0.01450 ± 0.0041
Arsénico Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.00003	0.00010	<0.00010	0.01800 ± 0.0038
Bario Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.0001	0.0003	0.0045 ± 0.00040	0.0075 ± 0.00070
Berilio Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.00002	0.00006	<0.00006	<0.00006
Bismuto Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.00001	0.00003	0.00350 ± 0.00046	<0.00003
Boro Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.002	0.006	<0.006	<0.006
Cadmio Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.00001	0.00003	<0.00003	<0.00003
Calcio Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.003	0.009	84.100 ± 2.17	82.000 ± 2.11
Cerio Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.00008	0.00024	0.01900 ± 0.0015	0.00450 ± 0.00036
Cesio Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.0001	0.0003	<0.0003	<0.0003
Cobalto Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.00001	0.00003	0.00050 ± 0.000050	0.00350 ± 0.00032
Cobre Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.00003	0.00009	<0.00009	0.08350 ± 0.021
Cromo Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.0001	0.0003	<0.0003	<0.0003
Estaño Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.00003	0.00010	0.00750 ± 0.0014	0.01200 ± 0.0023
Estroncio Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.0002	0.0006	0.0645 ± 0.0058	0.0660 ± 0.0059
Fósforo Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.015	0.047	0.974 ± 0.27	1.262 ± 0.35
Galio Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.00004	0.00012	<0.00012	<0.00012
Germanio Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.0002	0.0006	<0.0006	<0.0006
Hafnio Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.00005	0.00015	<0.00015	<0.00015
Hierro Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.0004	0.0013	0.0640 ± 0.0065	0.0370 ± 0.0037
Lantano Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.0005	0.0015	<0.0015	<0.0015
Litio Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.0001	0.0003	0.0100 ± 0.00090	0.0070 ± 0.00060
Lutecio Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.00002	0.00006	<0.00006	<0.00006
Magnesio Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.001	0.003	107.050 ± 12.85	104.300 ± 12.52
Manganeso Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.00003	0.00010	0.01550 ± 0.0011	0.01000 ± 0.00070
Mercurio Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.00003	0.00009	<0.00009	<0.00009
Molibdeno Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.00002	0.00006	<0.00006	<0.00006
Niobio Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.0005	0.0015	<0.0015	<0.0015
Níquel Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.0002	0.0006	<0.0006	<0.0006
Plata Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.000003	0.000010	0.008500 ± 0.0013	0.053500 ± 0.0080
Plomo Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.0002	0.0006	<0.0006	<0.0006
Potasio Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.04	0.13	40.33 ± 3.23	38.58 ± 3.090
Rubidio Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.0003	0.0009	<0.0009	<0.0009
Selenio Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.0004	0.0013	<0.0013	0.0190 ± 0.0044
Silice Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.09	0.27	1.11 * ± 0.090	1.00 * ± 0.080
Silicio Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.04	0.13	0.52 ± 0.060	0.47 ± 0.060
Sodio Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.006	0.019	384.100 ± 42.25	369.550 ± 40.65
Talio Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.00002	0.00006	<0.00006	<0.00006
Tantalio Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.0007	0.0021	<0.0021	<0.0021
Teluro Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.001	0.003	<0.003	<0.003
Thorio Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.00006	0.00019	<0.00019	<0.00019
Titanio Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.0002	0.0006	<0.0006	<0.0006
Uranio Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.000003	0.000010	<0.000010	<0.000010
Vanadio Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.0001	0.0003	0.0355 ± 0.0053	0.0350 ± 0.0053
Wolframio Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.0002	0.0006	<0.0006	<0.0006
Yterbio Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.00002	0.00006	<0.00006	<0.00006
Zinc Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.0008	0.0026	79.6500 ± 7.96	77.6000 ± 7.76
Zirconio Disuelto	EW EPA200 8 DIS CX	mg/L	0.00015	0.00045	<0.00045	<0.00045