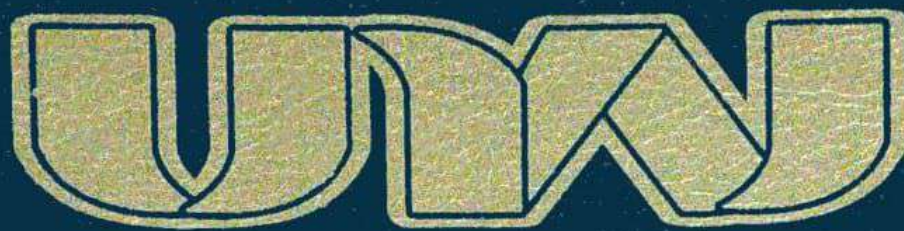




**UNIVERSIDAD NACIONAL DE JULIACA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA INGENIERÍA**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA**  
**AMBIENTAL Y FORESTAL**



**"AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE  
MICROORGANISMOS NATIVOS DE LOS RELAVES  
MINEROS DEL CENTRO POBLADO LA RINCONADA-  
PUNO"**

**Bach. Dina Eliana Coila Pancca**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE  
INGENIERO AMBIENTAL Y FORESTAL**

**ASESOR:  
M.Sc. Hugo Apaza Aquino**



**JULIACA - PERÚ**  
**2025**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE JULIACA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA INGENIERÍA**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA**  
**AMBIENTAL Y FORESTAL**



**"AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE  
MICROORGANISMOS NATIVOS DE LOS RELAVES  
MINEROS DEL CENTRO POBLADO LA RINCONADA-  
PUNO"**

**Bach. Dina Eliana Coila Pancca**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE  
INGENIERO AMBIENTAL Y FORESTAL**

**ASESOR:  
M.Sc. Hugo Apaza Aquino**



**JULIACA - PERÚ**  
**2025**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE JULIACA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA INGENIERÍA**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA**  
**AMBIENTAL Y FORESTAL**



**“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE  
MICROORGANISMOS NATIVOS DE LOS RELAVES  
MINEROS DEL CENTRO POBLADO LA RINCONADA-  
PUNO”**

**Bach. Dina Eliana Coila Pancca**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO**

**DE INGENIERO AMBIENTAL Y FORESTAL**

**Asesor: M.Sc. Hugo Apaza Aquino**

**Juliaca, 2025**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Coila, D. (2025). *Aislamiento y caracterización molecular de microorganismos nativos de los relaves mineros del centro poblado La Rinconada – Puno. (Tesis de pregrado)*. Universidad Nacional de Juliaca.

**Autor:** Coila Pancca Dina Eliana

**Título:** Aislamiento y caracterización molecular de microorganismos nativos de los relaves mineros del centro poblado La Rinconada – Puno.

**Publicación:** Juliaca, 2025

**Descripción:** Cantidad de páginas (130 páginas)

**Nota:** Tesis - Escuela profesional de Ingeniería Ambiental y Forestal - Universidad Nacional de Juliaca

**Código:** 01-000070-01/C74

**Nota:** Incluye bibliografía

**Asesor:** M.Sc. Hugo Apaza Aquino

**Palabras clave:** Aislamiento, microorganismos nativos, relaves mineros, Rinconada, secuenciación.

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE JULIACA**

**FACULTAD CIENCIAS DE LA INGENIERÍA**

**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL Y FORESTAL**

**“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE  
MICROORGANISMOS NATIVOS DE LOS RELAVES MINEROS DEL  
CENTRO POBLADO LA RINCONADA-PUNO”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE INGENIERO AMBIENTAL Y  
FORESTAL**

**Presentado por:**

**Bach. Dina Eliana Coila Pancca**

**Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:**

**Dr. Alejandro Félix Taquire Arroyo**

**PRESIDENTE DE JURADO**



**Mg. Cesar Enrique Yupanqui Bendita**

**JURADO (Secretario)**



**2° MIEMBRO**

**M.Sc. Milton Quispe Tisnado**

**JURADO (Vocal)**



**3° MIEMBRO**



**M. Sc. Hugo Apaza Aquino  
ASESOR DE TESIS**

# Dina Eliana Coila Pancca

## “AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE MICROORGANISMOS NATIVO

 Universidad Nacional de Juliaca

### Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid::3117:542763098

Fecha de entrega

22 dic 2025, 2:57 p.m. GMT-5

Fecha de descarga

22 dic 2025, 3:00 p.m. GMT-5

Nombre del archivo

BORRADOR CORRECCIÓN FORMATO\_DECP\_19\_12.pdf

Tamaño del archivo

3.3 MB

133 páginas

31.116 palabras

192.294 caracteres






## 11% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cá...

### Filtrado desde el informe


- Bibliografía
- Texto citado
- Texto mencionado
- Coincidencias menores (menos de 10 palabras)

### Fuentes principales

- 9%  Fuentes de Internet
- 2%  Publicaciones
- 7%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

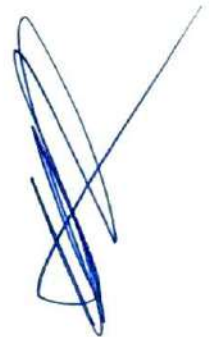
### Marcas de integridad

#### N.º de alerta de integridad para revisión

-  **Texto oculto**  
34 caracteres sospechosos en N.º de páginas  
El texto es alterado para mezclarse con el fondo blanco del documento.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.



## **DEDICATORIA**

*A mi familia, pilar fundamental de mi vida.*

*A mis padres y hermanos, por su apoyo incondicional, su fe inquebrantable y por estar siempre a mi lado en cada paso de este camino.*

*Y a mi amiga fiel, Canly, cuya compañía silenciosa y ronroneos alegres iluminaron incluso los días más difíciles.*

## **AGRADECIMIENTO**

*Elevo mi más sincero agradecimiento a Dios, por ser mi guía y fortaleza, brindándome sabiduría y protección durante todo el proceso de formación académica y la realización de mi tesis.*

*A la Universidad Nacional de Juliaca y a la Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental y Forestal, por haberme brindado la oportunidad de formarme como profesional. Extiendo mi gratitud al cuerpo docente, por compartir valiosos conocimientos que constituyen la base de mi carrera.*

*De manera muy especial, agradezco al M.Sc. Hugo Apaza Aquino, por su invaluable guía, sus acertados consejos y su disponibilidad durante todo el desarrollo de la investigación.*

*A mis queridos padres, les agradezco de todo corazón por ser el pilar fundamental de mi vida. Su apoyo incondicional, fe inquebrantable y constante sacrificio han sido el motor que me permitió alcanzar este logro.*

*A mis hermanos, por su compañerismo y por ofrecerme siempre su apoyo incondicional.*

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Pag.</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>i</b>
<b>AGRADECIMIENTO</b> .....	<b>ii</b>
<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	<b>iii</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>vii</b>
<b>ÍNDICE DE ANEXOS</b> .....	<b>ix</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>10</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>11</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>12</b>

### CAPÍTULO I

#### PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

1.1	Situación problemática .....	14
1.2	Formulación del problema .....	15
1.2.1	Problema general .....	15
1.2.2	Problemas específicos.....	15
1.3	Objetivos de investigación.....	16
1.3.1	Objetivo general .....	16
1.3.2	Objetivos específicos .....	16
1.4	Hipótesis .....	16
1.4.1	Hipótesis General .....	16
1.4.2	Hipótesis específica .....	16
1.5	Justificación de la investigación .....	17
1.5.1	Ambiental .....	17
1.5.2	Social .....	17
1.5.3	Económico .....	17
1.5.4	Técnico .....	18

### CAPÍTULO II

#### REVISIÓN DE LITERATURA

2.1	Antecedentes de la investigación .....	19
-----	--	----

2.1.1	Antecedentes internacionales .....	19
2.1.2	Antecedentes nacionales.....	20
2.1.3	Antecedentes regionales .....	22
2.2	Marco Teórico.....	23
2.2.1	Minería artesanal e informal.....	23
2.2.2	Relaves Mineros del Centro Poblado La Rinconada, Puno.....	24
2.2.3	Condiciones ambientales del área de estudio .....	25
2.2.4	Exposición a metales pesados.....	27
2.2.5	Impacto ambiental de los relaves mineros.....	28
2.2.6	Efectos sobre la biodiversidad microbiana.....	30
2.2.7	Potencial de los microorganismos nativos para la biorremediación.....	30
2.2.8	Aislamiento de microorganismos nativos .....	32
2.2.9	Caracterización molecular de microorganismos nativos.....	37

## **CAPÍTULO III**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

3.1	Ámbito de estudio.....	50
3.2	Tipo, nivel y diseño de la investigación .....	50
3.2.1	Tipo de la investigación.....	50
3.2.2	Nivel de la investigación .....	50
3.2.3	Diseño de la investigación.....	50
3.3	Población y muestra.....	51
3.3.1	Población .....	51
3.3.2	Tamaño de muestra.....	51
3.4	Materiales e instrumentos .....	52
3.4.1	Equipo e instrumentación .....	52
3.4.2	Material de laboratorio .....	52
3.4.3	Insumos y reactivos .....	52
3.4.4	Medios de cultivo .....	52
3.4.5	Software.....	53
3.5	Procedimiento metodológico .....	53
3.5.1	Caracterización fisicoquímica de los relaves mineros de La Rinconada..	53
3.6	Caracterización microscópica y macroscópica de microorganismos aislados de los relaves mineros .....	59

3.7	Caracterización macroscópica .....	61
3.8	Amplificación y secuenciación de los microorganismos aislados.....	64
3.9	Extracción de ADN.....	65
3.10	Amplificación por PCR .....	67
3.11	Verificación y secuenciación .....	69
3.12	Análisis bioinformático.....	70

## **CAPÍTULO IV**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

4.1	Caracterización fisicoquímica de los relaves mineros de La Rinconada.....	73
4.1.1	Parámetros físico-químicos in situ .....	73
4.1.2	Concentración de metales pesados (Hg).....	76
4.2	Caracterización microscópica y macroscópica los microorganismos aislados	80
4.2.1	Aislamiento de microorganismos nativos .....	80
4.2.2	Caracterización macroscópica y microscópica.....	80
4.2.3	Pruebas bioquímicas .....	83
4.3	Amplificación y secuenciación de los microorganismos aislados.....	86
4.3.1	Identificación molecular de la cepa M1 .....	86
4.3.2	Identificación molecular de la cepa M2 .....	89
4.3.3	Identificación molecular de la cepa S1 .....	93

## **CAPÍTULO V**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

5.1	Conclusiones.....	98
5.2	Recomendaciones .....	98
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>		<b>99</b>
<b>ANEXOS.....</b>		<b>117</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pag.</b>
<b>Tabla 1.</b> <i>Composición del medio de cultivo Agar nutritivo.</i> .....	34
<b>Tabla 2.</b> <i>Composición del medio de cultivo Agar Infusión Cerebro-Corazón.</i> .....	35
<b>Tabla 3.</b> <i>Composición del medio de cultivo Agar Sangre.</i> .....	35
<b>Tabla 4.</b> <i>Actividades de extracción ubicada en el Centro poblado La Rinconada</i>	53
<b>Tabla 5.</b> <i>Puntos de muestreo- Google Earth</i> .....	54
<b>Tabla 6.</b> <i>Parámetros de campo</i> .....	58
<b>Tabla 7.</b> <i>Reactivos, volúmenes y concentraciones finales usadas para la PCR...</i>	68
<b>Tabla 8.</b> <i>Valores de pH, temperatura y conductividad</i> .....	73
<b>Tabla 9.</b> <i>Comparación de concentraciones de metales pesados (Hg) por punto.</i> .	76
<b>Tabla 10.</b> <i>Concentración de metales pesados (Hg) en muestra de sedimento.</i> .....	77
<b>Tabla 11.</b> <i>Concentración de metales pesados y límites máximos permisibles (LMP)</i> .....	78
<b>Tabla 12.</b> <i>Identificación del género bacteriano</i> .....	85

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Pag.</b>
<b>Figura 1.</b> <i>Composición del ribosoma bacteriano (70S).</i> .....	41
<b>Figura 2.</b> <i>Esquema de la organización de un operón de ARN ribosomal.</i> .....	42
<b>Figura 3.</b> <i>Representación esquemática de la cadena lineal del ARNr 16S.</i> .....	43
<b>Figura 4.</b> <i>Mapa de puntos de toma de muestras</i> .....	54
<b>Figura 5.</b> <i>Frascos para toma de muestras</i> .....	55
<b>Figura 6.</b> <i>Microorganismos con potencial de crecimiento en la sal metálica (HgCl<sub>2</sub>).</i> .....	61
<b>Figura 7.</b> <i>Cepas aisladas y purificadas</i> .....	64
<b>Figura 8.</b> <i>Etapas de la PCR. Temperaturas, tiempos y ciclos estándares.</i> .....	68
<b>Figura 9.</b> <i>Diagrama de proceso de secuenciación</i> .....	72
<b>Figura 10.</b> <i>Comparativa de valores de pH en muestras de agua y sedimentos.</i> .....	73
<b>Figura 11.</b> <i>Comparativa de la temperatura entre muestras de agua y sedimentos</i> .....	74
<b>Figura 12.</b> <i>Conductividad eléctrica (μS/cm) en muestras de agua y sedimento.</i> ..	75
<b>Figura 13.</b> <i>Concentración de metales pesados (Hg) y LMP (mercurio total).</i> .....	78
<b>Figura 14.</b> <i>Cultivos puros: Bacillus (a), Klebsiella (b), Staphylococcus (c)</i> .....	81
<b>Figura 15.</b> <i>Representación del árbol filogenético de la muestra M1</i> .....	86
<b>Figura 16.</b> <i>Electroferograma de la cepa M1</i> .....	87
<b>Figura 17.</b> <i>Representación del árbol filogenético de la muestra M2</i> .....	90
<b>Figura 18.</b> <i>Electroferograma de la cepa M2</i> .....	91
<b>Figura 19.</b> <i>Representación de árbol filogenético para la muestra S1</i> .....	93
<b>Figura 20.</b> <i>Electroferograma de la cepa S1.</i> .....	94
<b>Figura 21.</b> <i>Medición de pH en muestras de agua</i> .....	128
<b>Figura 22.</b> <i>Cadena de custodia</i> .....	128
<b>Figura 23.</b> <i>Toma de muestras para análisis</i> .....	128
<b>Figura 24.</b> <i>Recolección de muestra</i> .....	128
<b>Figura 25.</b> <i>Muestra de sedimentos</i> .....	129
<b>Figura 26.</b> <i>Medición de turbidez</i> .....	129
<b>Figura 27.</b> <i>Preparación de Agar Cerebro - Corazón</i> .....	129
<b>Figura 28.</b> <i>Preparación de Agar Nutritivo</i> .....	129
<b>Figura 29.</b> <i>Medio de cultivo Agar Sangre</i> .....	130
<b>Figura 30.</b> <i>Prueba Bioquímica Oxidasa</i> .....	130

<b>Figura 31.</b> <i>Pruebas bioquímicas TSI</i> .....	130
<b>Figura 32.</b> <i>Distribución de pruebas bioquímicas</i> .....	130

## ÍNDICE DE ANEXOS

	<b>Pag.</b>
<b>Anexo 1.</b> Reporte de resultados de laboratorio M1 código N° 7051-2024.....	118
<b>Anexo 2.</b> Reporte de resultados de laboratorio M2 código N° 7052-2024.....	120
<b>Anexo 3.</b> Reporte de resultados de laboratorio M3 código N° 7053-2024.....	122
<b>Anexo 4.</b> Reporte de resultados de laboratorio S1 código N° 7054-2024.....	124
<b>Anexo 5.</b> Resultados del proceso de secuenciación M1, M2 y S1 .....	126
<b>Anexo 6.</b> Panel fotográfico .....	128

## RESUMEN

Los relaves mineros generados por actividad minera artesanal del centro poblado La Rinconada, evidencia altas concentraciones de metales pesados en fuentes de agua de cabecera de cuenca degradando estos ecosistemas. Por ello este estudio se enfocó en la importancia de aislar y caracterizar molecularmente microorganismos nativos que se encuentran presentes en los relaves mineros. La metodología del estudio comprendió las siguientes etapas: Primero, se recolectaron muestras de agua y sedimento y se determinaron sus parámetros fisicoquímicos mediante los métodos estándar de la APHA; posteriormente, se realizó el aislamiento de microorganismos en medios de cultivo selectivos Agar Nutritivo y Agar Cerebro-Corazón; las cepas aisladas fueron caracterizadas mediante análisis morfológicos y bioquímicos; finalmente, se extrajo el ADN de las cepas seleccionadas, se amplificó el gen 16S rRNA mediante PCR, y las secuencias obtenidas por secuenciación Sanger fueron analizadas utilizando la herramienta bioinformática BLAST. Se identificaron tres cepas de interés: M1, con un 99.6% de similitud con *Bacillus sp.* y 99.56% con *Rossellomorea vietnamensis*, formando un clado filogenético propio que sugiere una posible nueva especie dentro del género *Rossellomorea*; M2, con un 100% de similitud con *Micrococcus endophyticus*; y S1, con un 99.89% con *Staphylococcus hominis*; estas cepas presentan rasgos de adaptación a condiciones extremas, como resistencia a pH alcalino, alta salinidad y presencia de metales pesados. La investigación demostró que los relaves mineros del área de estudio albergan una microbiota diversa y resiliente con significativo potencial biotecnológico para la biorremediación. La complementariedad entre las técnicas microbiológicas clásicas y los métodos moleculares posibilitó la identificación precisa de cepas nativas con adaptaciones específicas a ecosistemas impactados por metales pesados, estableciendo los fundamentos para el diseño de estrategias de biorremediación aplicables y ambientalmente sostenibles.

**Palabras clave:** aislamiento, microorganismos nativos, relaves mineros, Rinconada, secuenciación.

## ABSTRACT

The mining tailings generated by artisanal mining activity in the populated center of La Rinconada show high concentrations of heavy metals in headwater basin sources, degrading these ecosystems. Therefore, this study focuses on the importance of isolating and molecularly characterizing native microorganisms present in the mining tailings. The study methodology comprised the following stages: First, water and sediment samples were collected and their physicochemical parameters were determined using APHA standard methods; subsequently, microorganisms were isolated on selective culture media, Nutrient Agar and Brain-Heart Infusion Agar; the isolated strains were characterized through morphological and biochemical analyses; finally, DNA was extracted from the selected strains, the 16S rRNA gene was amplified by PCR, and the sequences obtained by Sanger sequencing were analyzed using the BLAST bioinformatics tool. Three strains of interest were identified: M1, with 99.6% similarity to *Bacillus sp.* and 99.56% to *Rossellomorea vietnamensis*, forming its own phylogenetic clade that suggests a possible new species within the genus *Rossellomorea*; M2, with 100% similarity to *Micrococcus endophyticus*; and S1, with 99.89% similarity to *Staphylococcus hominis*; these strains exhibit traits of adaptation to extreme conditions, such as resistance to alkaline pH, high salinity, and the presence of heavy metals. The research demonstrates that the mining tailings in the study area host a diverse and resilient microbiota with significant biotechnological potential for bioremediation. The complementarity between classical microbiological techniques and molecular methods enabled the precise identification of native strains with specific adaptations to ecosystems impacted by heavy metals, establishing the foundation for the design of applicable and environmentally sustainable bioremediation strategies.

**Key words:** isolation, native microorganisms, mining tailings, Rinconada, sequencing.

## INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas hídricos altoandinos, esenciales para la biodiversidad y el equilibrio ecológico regional, enfrentan una creciente amenaza por la contaminación derivada de la actividad minera, particularmente por la presencia de metales pesados, que afectan la calidad del agua, los suelos y la salud humana (Custodio et al., 2018; Llambí et al., 2019; Moreno-Aguirre et al., 2024). El riesgo ambiental latente que representan los depósitos de relaves mineros en las zonas de alta montaña del Perú es significativo, especialmente en un contexto donde se reportan más de 6900 sitios contaminados por residuos de esta actividad (INEI, 2022). Dicho riesgo deriva de la exposición a agentes tóxicos, con predominio del mercurio, y se ve exacerbada por la inexistencia de un marco regulatorio adecuado para su control y remediación (Cacciuttolo et al., 2023; Huaranga Moreno et al., 2021).

La minería informal en La Rinconada (Puno) constituye un caso emblemático de crisis socioambiental. Esta actividad, caracterizada por métodos extractivos rudimentarios y el uso indiscriminado de mercurio para la recuperación de oro, genera impactos severos (Zaynab et al., 2022). La inadecuada disposición de relaves mineros, que contienen este metal pesado, los convierte en peligrosos pasivos ambientales que contaminan suelos, cuerpos de agua superficiales y subterráneos, y la atmósfera (Arce, 2023; Menéndez & Muñoz, 2021). Frente a este escenario, se hace imperativo desarrollar estrategias de remediación innovadoras, sostenibles y técnicamente viables. Si bien existen técnicas convencionales de descontaminación, su aplicabilidad en contextos rurales y de alta vulnerabilidad como La Rinconada es limitada debido a su alto costo y complejidad. La biorremediación surge como una alternativa promisoría, la cual emplea microorganismos nativos adaptados a las condiciones extremas de la zona (Sable et al., 2024). Se ha demostrado que estas bacterias autóctonas, provenientes de ecosistemas contaminados, poseen una notable resiliencia a dichos ambientes adversos (Cáceda Quiroz et al., 2024). Con el objetivo de atenuar los efectos perjudiciales de los desechos mineros, este enfoque utiliza a los microorganismos como agentes principales para la desintoxicación de diversos contaminantes, aprovechando su capacidad metabólica (Cáceda Quiroz et al., 2024; Oudjehani et al., 2002). Históricamente, la asignación taxonómica en microorganismos se fundamentaba en criterios fenotípicos (bioquímicos, antigénicos y fisiológicos). La genómica marcó un punto de inflexión, transitando desde el estudio de características fisicoquímicas del ADN hasta la comparación de secuencias de genes

concretos. Sin embargo, las modernas técnicas de secuenciación de alto rendimiento han redefinido el concepto de especie, exigiendo una aproximación que trasciende la similitud en fragmentos genómicos puntuales (Cortés-López et al., 2020; Valenzuela-González et al., 2015).

Este estudio se llevó a cabo en los relaves mineros ubicados en el centro poblado La Rinconada, distrito de Ananea, en la región Puno, una de las zonas más impactadas por la minería informal en el Perú. El trabajo comprendió la caracterización físico-química de los relaves contaminados, así como el aislamiento, identificación morfológica y caracterización molecular de los microorganismos nativos presentes en dicho ambiente. A través del uso de técnicas microbiológicas y genéticas, se identificó cepas microbianas con potencial de resiliencia a metales pesados, especialmente mercurio, como base para su futura aplicación en procesos de biorremediación. El estudio no contempla aún la aplicación directa de estrategias de remediación in situ, sino que se enfoca en la fase exploratoria y de caracterización, como paso inicial para el desarrollo de tecnologías sostenibles de recuperación ambiental.

Para lograr este objetivo se llevaron a cabo actividades de aislamiento y caracterización de los microorganismos nativos presentes en los relaves mineros, destacando sus características morfológicas y moleculares (Rohmah & Retnaningrum, 2023). En este contexto, resulta fundamental identificar y caracterizar los microorganismos nativos en los relaves mineros del centro poblado La Rinconada – Puno, como base para el desarrollo de tecnologías sostenibles que mitiguen la contaminación causada por la minería informal.

# CAPÍTULO I

## PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

### 1.1 Situación problemática

Los relaves mineros, principal residuo de la extracción y tratamiento de recursos minerales, corresponden a los materiales remanentes que se separan del mineral valioso durante el procesamiento. Esta mezcla de agua, minerales, rocas y tierras representa uno de los desafíos más significativos en su manejo y disposición final para la industria minera (Menéndez & Muñoz, 2021). El principal riesgo ambiental radica en la potencial filtración de estos elementos hacia el suelo y las fuentes de agua, lo que contamina los ecosistemas circundantes, amenaza la biodiversidad y representa un serio peligro para la salud humana (CIES, 2021). La utilización de mercurio en la extracción del mineral lo ha posicionado como uno de los contaminantes más críticos de esta actividad, dada su persistencia y toxicidad (Beltrán Pineda & Gómez Rodríguez, 2016; Briffa et al., 2020). Este metal no esencial contamina suelos y recursos hídricos, y su presencia ha experimentado un aumento a nivel global en las últimas décadas (ONU, 2019).

La generación de relaves mineros derivada de las actividades extractivas constituye un problema de alcance global (Lalangui Pulla et al., 2021). Los grandes volúmenes producidos representan una preocupación ambiental, ya que, de no ser gestionados adecuadamente, pueden liberar sustancias potencialmente tóxicas que ponen en riesgo los ecosistemas y la salud pública. En países como Brasil, Ecuador y Chile, la gestión de estos residuos enfrenta grandes desafíos (Reveco, 2025). El Perú, reconocido por su sólida industria minera y por ser uno de los principales productores de minerales metálicos y no metálicos, no es ajeno a esta problemática. La minería artesanal e informal, especialmente en la extracción de oro, es la principal fuente de contaminación por metales pesados, afectando regiones como Madre de Dios, Puno y otras zonas altoandinas (Kahhat et al., 2019; Martínez & Casallas, 2018).

En la región de Puno, particularmente en el centro poblado La Rinconada, esta actividad ha generado graves pasivos ambientales. Debido a la aplicación ineficiente y no regulada de mercurio en la amalgamación provoca pérdidas de cerca de 10 gramos por tonelada de mineral, liberando mercurio líquido a relaves y posteriormente a cuerpos de agua que contaminan arroyos, discurriendo hacia la laguna La Rinconada y, finalmente, el lago

Titicaca a través del río Ramis (Hinojosa-Carrasco, 2016; Lobato Flores, 2013; Loza del Carpio & Ccancapa Salcedo, 2020). Esta contaminación impacta gravemente al ecosistema y la salud de la población local.

En ambientes naturales, el crecimiento microbiano está determinado por la concentración de nutrientes asimilables, así como por factores ambientales y fisicoquímicos. La caracterización molecular de microorganismos nativos es fundamental, ya que revela en su genética rastros de una compleja historia evolutiva, incluyendo procesos como recombinación homóloga, pérdida y duplicación de genes, y transferencia horizontal de material genético (Zhou et al., 2020). Actualmente, los microorganismos asociados a ambientes contaminados con metales pesados, como los relaves mineros, aún no han sido estudiados en profundidad. Por lo tanto, es esencial encontrar alternativas sostenibles para el manejo de los relaves mineros en la región, conociendo desde los microorganismos presentes y aplicando consorcios microbianos para un adecuado aprovechamiento y eficiencia en la aplicación de tecnologías como la bioremediación.

## **1.2 Formulación del problema**

### **1.2.1 Problema general**

¿Qué microorganismos nativos, caracterizados a nivel molecular, están presentes en los relaves mineros del centro poblado La Rinconada, Puno?

### **1.2.2 Problemas específicos**

- ¿Cuáles son las características fisicoquímicas que convierten a los relaves mineros de La Rinconada en un sitio idóneo para la prospección de microorganismos extremófilos con aplicaciones en biorremediación?
- ¿Cuáles son las características morfológicas a nivel colonial y celular que presentan los microorganismos aislados de los relaves mineros de La Rinconada, y cómo se correlacionan estas con un fenotipo de tolerancia a metales pesados?
- ¿La identificación molecular de los aislados mediante secuenciación genética confirma que pertenecen a géneros con un potencial biotecnológico documentado para la recuperación de suelos y aguas impactadas por minería?

### **1.3 Objetivos de investigación**

#### **1.3.1 Objetivo general**

Aislar y caracterizar a nivel molecular microorganismos nativos a partir de los relaves mineros del centro poblado La Rinconada - Puno.

#### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Caracterizar físico químicamente los relaves mineros del centro poblado La Rinconada-Puno.
- Caracterizar macroscópica y microscópicamente microorganismos aislados de los relaves mineros del centro poblado La Rinconada -Puno
- Amplificar y secuenciar los microorganismos aislados de los relaves mineros del centro poblado La Rinconada.

### **1.4 Hipótesis**

#### **1.4.1 Hipótesis General**

Los niveles altos de contaminación que presentan los relaves mineros han seleccionado naturalmente una comunidad de microorganismos nativos tolerantes, cuya identificación molecular revelará su pertenencia a grupos taxonómicos con resistencia y potencial para aplicaciones en biorremediación.

#### **1.4.2 Hipótesis específica**

- Las muestras de agua y sedimento de los relaves mineros en estudio presentarán propiedades fisicoquímicas distintivas, caracterizadas por niveles elevados de metales pesados que superan los límites permisibles para cuerpos de agua y suelos, lo que confirma su potencial de impacto ambiental
- En condiciones ambientales extremas, es posible aislar microorganismos nativos a partir de muestras de relaves mineros, y que presenten capacidad de crecimiento en medios enriquecidos con metales pesados.
- Si los microorganismos aislados están adaptados a la presencia de metales, entonces su identificación mediante la secuenciación de genes marcadores filogenéticos mostrará una alta similitud con especies o géneros conocidos por sus genes de resistencia a metales.

## **1.5 Justificación de la investigación**

### **1.5.1 Ambiental**

Este proyecto se justifica en la urgente necesidad de tratar los efluentes mineros y recuperar las aguas contaminadas, buscando desarrollar una solución que permita el aprovechamiento seguro de este recurso, eliminando los riesgos para la salud humana y de los ecosistemas. En este contexto se propone como alternativa el uso de microorganismos nativos, debido a su capacidad metabólica para reducir y absorber metales pesados, ofreciendo una opción ecológica y eficiente. Este conocimiento abre la puerta a estrategias de bioingeniería y optimización para potenciar su capacidad natural de remediación. No obstante, la efectividad de esta estrategia depende de las particularidades del sitio, como la composición mineral de los relaves, las condiciones climáticas y las propiedades edáficas. Por ello, es indispensable caracterizar molecularmente las comunidades microbianas nativas de los relaves mineros del área de estudio. Esta aproximación permitirá identificar una microbiota diversa con relevante potencial biotecnológico, lo cual es fundamental para optimizar los procesos de biorremediación.

### **1.5.2 Social**

La presente investigación busca generar un aporte significativo para las comunidades vulnerables expuestas a la minería, como La Rinconada, al proponer estrategias de mitigación de riesgos basadas en evidencia científica derivada del estudio de los relaves. La exposición a estos contaminantes deteriora la calidad de vida, reduce la productividad y aumenta los costos de atención médica, afectando el bienestar social. Por ello, resulta indispensable implementar tecnologías de remediación ambiental que reduzcan la concentración de dichos contaminantes, protegiendo la salud pública y mitigando los impactos sociales negativos (Ballabio et al., 2021).

### **1.5.3 Económico**

La presente investigación se justifica económicamente al proponer una alternativa de remediación que reduce significativamente los costos operativos y de infraestructura en comparación con las tecnologías convencionales. Los métodos tradicionales de tratamiento de aguas contaminadas con metales pesados requieren inversiones sustanciales en equipos, energía y productos químicos, además de generar gastos

recurrentes de mantenimiento, lo que limita su viabilidad en zonas mineras o rurales con recursos limitados. Frente a esto, el uso de microorganismos autóctonos representa una solución costo-eficiente, ya que aprovecha recursos biológicos locales, minimiza la dependencia de insumos externos y reduce el consumo energético al utilizar procesos naturales de biodegradación. Además, la caracterización molecular de estos microorganismos permite optimizar su aplicación, evitando gastos asociados a la adquisición de cultivos comerciales y asegurando una adaptabilidad que prolonga la vida útil del sistema. En conjunto, estos factores no solo disminuyen los costos iniciales y operativos, sino que también generan ahorros a mediano y largo plazo en salud pública y gestión ambiental, fortaleciendo la sostenibilidad económica de las comunidades afectadas.

#### **1.5.4 Técnico**

La presente investigación se justifica técnicamente en la capacidad bioquímica y ecológica de los microorganismos nativos, lo cual les permite degradar diversos contaminantes (orgánicos e inorgánicos) y tolerar metales pesados, características que los posicionan como una herramienta prometedora para la recuperación de aguas contaminadas. Las técnicas tradicionales no resultan siempre eficientes para remover metales pesados lo que incrementa costos y reduce su aplicabilidad sobre todo en zonas rurales o mineras (Yan et al., 2022). Como alternativa, la biorremediación aprovecha la capacidad metabólica de microorganismos nativos para transformar y eliminar contaminantes, mostrando alta eficiencia y reducida complejidad operativa. Complementariamente, la caracterización molecular de estas comunidades permite identificar taxones funcionales y vías metabólicas específicas, optimizando el diseño de sistemas con ventajas operativas mejoradas.

## CAPÍTULO II

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### 2.1 Antecedentes de la investigación

##### 2.1.1 Antecedentes internacionales

Kumar et al., (2024) aislaron cepas tolerantes a metales pesados a partir de efluentes industriales y su caracterización frente a cada contaminante. Las cepas se identificaron mediante el gen 16s rRNA y se utilizaron para la eliminación de metales de los efluentes industriales. Los análisis ICP-MS y de dispersión de energía de rayos X (EDX) de la biomasa revelaron que una proporción significativa de cadmio (90,89%) y plomo (94,87%) disponibles en el efluente fueron secuestrados dentro de la biomasa bacteriana, la cepa seleccionada se caracterizó bioquímica y molecularmente resultando ser *Staphylococcus epidermidis*.

Yao et al., (2023) aislaron cepas bacterianas tolerantes a metales pesados de suelos mineros contaminados, evaluando su resistencia y capacidad de eliminación. Determinaron la cepa LBA119 resistente al mercurio de suelos contaminados en Luanchuan (China), identificándola como Bacillus Gram-positivo mediante tinción de Gram, pruebas bioquímicas y secuenciación de 16S rDNA. Los experimentos mostraron que LBA119 tolera altas concentraciones de Hg<sup>2+</sup> (CMI: 32 mg/L) y otros metales (Pb<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>); en condiciones óptimas (2% inóculo, pH 7, 30 °C, 20 g/L sal), eliminó el 97,32% de Hg<sup>2+</sup> (10 mg/L) en 36 h (89,08% por volatilización, 8,24% por adsorción). En suelos contaminados con 50–100 mg/L de Hg<sup>2+</sup>, la inoculación aumentó la remediación en un 15,54–37,67% tras 30 días; mostrando que posee alto potencial para biorremediar suelos mercuriales.

Lee, Aziz, & Tajarudin (2023) evaluaron la eliminación de estos metales mediante un sistema de columna con zeolita inmovilizada con bacterias oxidadoras de hierro (IOB), analizando distintos tiempos de retención. Se aisló y cultivó en laboratorio la cepa *Rosellomorea* sp. (una IOB) para inmovilizarla en zeolita natural, sustituyendo los filtros de arena convencionales. Los resultados mostraron que la zeolita con *Rosellomorea* sp. eliminó el 99.34% de Fe y el 88.92% de Mn, mientras que la zeolita sin inmovilización logró remociones del 93.62% (Fe) y 93.73% (Mn). La presencia de la bacteria aceleró la oxidación de hierro, mejorando su remoción.

Santana Flores et al. (2020), evaluaron la tolerancia bacteriana mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria frente a sales metálicas con propiedades de bioacumulación (Ag, Pb, Cr, Cd) y biotransformación (As (III) y Cr<sup>6+</sup>), la identificación taxonómica lo efectuaron a través de la secuenciación del gen ARNr 16S. Observaron una gradiente de tolerancia a metales en el cual mostraron que solo el 9.24% y 39% de los aislados tuvieron capacidad de bioacumular Zn<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> y Ag<sup>2+</sup>, en cuanto a la biotransformación, el 9% oxidaron As<sup>3+</sup> a As<sup>5+</sup>, mientras que el 7% y 24% redujeron As<sup>5+</sup> a As<sup>3+</sup> y Cr<sup>6+</sup> a Cr<sup>3+</sup>, entre los géneros predominantes identificaron *Chryseobacterium sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Stenotrophomonas sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *Serratia sp.* y *Enterobacter sp.*

Yan et al. (2020) investigaron la relación entre la actividad microbiana, la comunidad, los genes de resistencia a los antibióticos (ARG) y los metales traza en el suelo que rodea los vertederos de residuos mineros de oro. De acuerdo a ello reportaron que la mayoría de las bacterias resistentes a los metales pertenecen a Actinobacteria y Proteobacteria también observaron que los metales provenientes de la actividad minera pueden provocar co-selección de resistencia a antibióticos, debido a mecanismos de co-resistencia o resistencia cruzada, el análisis PLS-PM sugirió que los metales podrían afectar indirectamente los genes de resistencia a antibióticos (ARG) al influir en la diversidad bacteriana de las zonas mineras auríferas.

Sibanda et al. (2019) investigaron la concentración de metales pesados en los residuos mineros de oro y utilizaron técnicas de secuenciación de alto rendimiento para determinar la diversidad de la comunidad microbiana. Analizaron secuencias basados en el gen ARNr 16S reportando un total de 273.398 lecturas en las cinco muestras, representadas en 7 filos principales, 41 clases, 77 órdenes, 142 familias y 247 géneros principales, encontraron que el filo Actinobacteria fue el más dominante, seguido de *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria* y *Planctomycetes*, el análisis funcional predictivo identificó posibles vías biosintéticas y degradativas en las cinco muestras analizadas.

### **2.1.2 Antecedentes nacionales**

Cáceda Quiroz et al. (2024) en su estudio caracterizaron la diversidad bacteriana de suelos de minas abandonadas. Su metodología consistió en el aislamiento de cepas, extracción de ácidos nucleicos (ADN), y la posterior amplificación y secuenciación del

gen 16S ARNr. El análisis filogenético, realizado mediante el método de Máxima Verosimilitud (ML) con la herramienta RaXML, permitió identificar géneros bacterianos. Reportaron nueve aislamientos y agruparon filogenéticamente en seis grupos que corresponderían a los géneros *Bacillus*, *Cytobacillus*, *Paenibacillus*, *Microbacterium*, *Peribacillus*, *Acinetobacter*, resaltando así el potencial inexplorado de estas bacterias para ser utilizadas en procesos de bioremediación y como indicadoras de contaminación.

Gongora Flores (2021) investigó acerca de los consorcios microbianos autóctonos provenientes de fuentes hídricas con contaminación minera, utilizó la secuenciación del gen 16S ARNr. Identificó molecularmente la presencia de la cepa bacteriana A4 correspondiente al género *Halomona*, realizó el modelo matemático y verificó el comportamiento de la cepa bacteriana respecto al proceso de remoción de mercurio según transcurrido el tiempo se encontró que su valor se encuentra por encima del 96%, mostrando así su factibilidad en la bioremediación.

Muñoz-Silva et al. (2019) investigaron el grado de tolerancia a metales pesados de hongos y bacterias aislados de suelos con y sin rizósfera, con el propósito de conocer su potencial para aplicaciones en bioremediación, los hongos y bacterias aisladas se identificaron taxonómicamente mediante el análisis de la región ITS y 16S ADN<sub>r</sub>, respectivamente. Aislaron 23 hongos y 18 bacterias, las cepas de bacterias con mayores índices de tolerancia fueron *Bacillus licheniformis* SSR18 (Cd<sup>+2</sup>, Ni<sup>+2</sup> y Zn<sup>+2</sup>), *Bacillus subtilis* SSR3 (Pb<sup>+2</sup>), *Serratia* sp. SSR15 (Cu<sup>+2</sup>), *Serratia* sp. SSR13 (Ag<sup>+1</sup>) y *Bacillus cereus* SSR01 (Cr<sup>+6</sup>).

Rodríguez Rendón & Paredes Aranzamendi (2019) reportaron una reducción del 50% en la concentración de metales (mg/L) en relaves mineros tratados con un consorcio microbiano en una celda de combustible. Destacando así el potencial del sistema y los microorganismos en el proceso de biorremediación; mediante la identificación molecular reportaron las siguientes familias de microorganismos: *Serratia*, *Erwinia*, *Rhodococcus*, *Agrobacterium* y *Acinetobacter*.

Sernaque Aguilar et al. (2019) investigaron las comunidades bacterianas en pozas de lixiviación con cianuro mediante una estrategia que integraba cultivo y metagenómica. Las cepas puras se aislaron e identificaron con métodos convencionales y moleculares, mientras que el microbioma total se perfiló mediante secuenciación masiva del 16S

rRNA. Los análisis revelaron que los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Acinetobacter* dominaban en las cepas cultivables. En contraste, en las muestras de suelo, reportaron que las bacterias no cultivables con mayor abundancia son los filos *Proteobacteria* (12.91%), *Firmicutes* (11.32%), *Actinobacteria* (11.25%) y *Bacteroidetes* (10.16%). En el caso del agua, los filos predominantes fueron *Firmicutes* (59.16%) y *Actinobacteria* (38.99%).

### 2.1.3 Antecedentes regionales

Novoa et al (2022), determinaron la presencia de metales pesados derivados de la minería artesanal en las provincias de Sandia, Carabaya y San Antonio de Putina (Puno). Para ello, analizaron siete muestras de agua de zonas aledañas a la actividad minera mediante espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES). Adicionalmente, evaluaron diez muestras del centro poblado de La Rinconada utilizando un analizador directo de mercurio Milestone DMA-80. En La Rinconada, zona con más de 400 contratistas mineros y una población aproximada de 30,000 habitantes, los niveles de mercurio oscilaron entre 0,0013 y 0,0188 mg/L, superando los límites establecidos por las normas nacionales e internacionales. Estos resultados evidencian el impacto negativo de la minería artesanal en los ecosistemas y la salud de las comunidades aledañas.

Machaca (2017) investigó la resistencia in vitro al plomo y mercurio por la comunidad bacteriana de las aguas del río Ramis - Puno, Perú; utilizando medio de cultivo con Pb y Hg a concentraciones de 200, 500, 1000 y 2000 µg/ml, la cantidad de inoculación se hizo a través de la escala de McFarland estándar de turbidez 0,5. Identificó seis géneros bacterianos: *Serratia*, *Klebsiella*, *Staphylococcus*, *Escherichia*, *Streptococcus* y *Enterobacter*, estas bacterias presentaron resistencia al Pb y Hg en todas las concentraciones, pero los recuentos bacterianos fueron variables en los tratamientos, siendo estadísticamente diferentes entre todos los factores ( $p < 0,0001$ ).

El estudio de Ayamamani (2019) evaluó el riesgo de contaminación por relaves mineros en suelos y sus impactos ambientales. Mediante análisis comparativo de metales pesados (según ECA y LMP), observaciones in situ e identificación de fuentes contaminantes, se determinó que los suelos superan los límites permisibles, careciendo de canchas de sedimentación. Las principales causas incluyen vertidos de aguas residuales de plantas de beneficio, escorrentías de desmontes y drenajes ácidos, que fluyen hacia la laguna

Rinconada. Los resultados revelaron concentraciones críticas de mercurio (Hg), como 0.750 mg/kg en suelos y 0.00015 mg/l en agua, excediendo los ECAs (0.0001 mg/l). El Hg, al ser insoluble, persiste en sedimentos. El estudio concluye urge implementar medidas de remediación (biosorción, fitorremediación) y concientizar a la población de Puno, afectada por la contaminación del río Ramís durante lluvias, mediante filtraciones y escurrimientos.

## **2.2 Marco Teórico**

### **2.2.1 Minería artesanal e informal**

A nivel global, alrededor de 20 millones de personas en más de 80 países se dedican a la minería de oro artesanal y de pequeña escala, incluyendo entre 4 y 5 millones de mujeres y menores de edad. Esta actividad, que frecuentemente carece de regulación y presenta condiciones inseguras, es responsable del 37% de la contaminación mundial por mercurio, superando a cualquier otro sector (PNUMA, 2023; Telmer & Veiga, 2009).

Las actividades de minería artesanal y de pequeña escala (MAPE) son muy variadas; en ocasiones son ilegales o informales. Estas actividades pueden ser estacionales, continuas a lo largo del año, de larga duración o sujetas a ciclos de auge y declive (Buxton, 2013; Organización Mundial de la Salud, 2017).

La pequeña minería y la minería artesanal funcionan como una fuente de sustento y una posibilidad de progreso, además de constituir una herramienta clave para la inclusión social y la reducción de la pobreza en las regiones más remotas del país, donde el oro es el metal más extraído en estas prácticas (MINEM, 2024).

La minería informal, enfocada principalmente en la extracción de oro, utiliza grandes cantidades de mercurio. Cuando este no se maneja de manera adecuada, genera contaminación y daños significativos en los cuerpos de agua y los suelos donde se llevan a cabo las actividades mineras (Rojas & Gárate, 2011).

En el Perú, la actividad minera –tanto formal como informal– se desarrolla en las veinticinco regiones del país, aprovechando su diversidad geológica. Esta incluye, por un lado, yacimientos aluviales en la cuenca amazónica (como los de Madre de Dios y sectores de Puno y Loreto) y, por otro, depósitos filoneanos y vetas diseminadas, localizados principalmente en la región andina y costera (MINEM, 2024).

## 2.2.2 Relaves Mineros del Centro Poblado La Rinconada, Puno

### a. Caracterización física y química de los relaves

#### Composición mineralógica

El procesamiento de minerales genera una gran cantidad de residuos conocidos como relaves. Los relaves son normalmente una suspensión en la que la fracción sólida está compuesta por la mezcla de roca triturada y molida y la fracción acuosa está compuesta por los fluidos de procesamiento de las operaciones de molienda, lavado y concentración (Wang et al., 2014).

La minería inevitablemente produce transformaciones y efectos sobre el medio ambiente; algunos son productos de desecho de la minería (Smith, 2019). Como residuos mineros entendemos a) las rocas removidas en el procedimiento de explotación que no son procesadas -llamadas estériles-, y b) los minerales, químicos, e incluso el agua utilizada para los tratamientos de extracción de compuestos de alto valor económico, que generan relaves (Sociedad Nacional de Minería de Chile, 2016).

#### Concentración de metales pesados

En diversas regiones del mundo, los mineros artesanales y de pequeña escala emplean mercurio para la extracción de oro. Las condiciones que favorecen su uso incluyen: su bajo costo en comparación con el precio del oro, su fácil acceso, su sencillez de manejo y su versatilidad para ser utilizado en múltiples ubicaciones. Mediante amalgamación con mercurio, los mineros pueden concentrar oro en menos de 24 horas (PNUMA, 2015).

El proceso de uso del mercurio en la extracción de oro artesanal y de pequeña escala generalmente sigue estos pasos:

**Extracción del material:** Los mineros trabajan en yacimientos aluviales (sedimentos depositados por ríos) o en yacimientos de roca dura (generalmente oro contenido en vetas de cuarzo). El tipo de yacimiento es crucial, ya que define la estrategia para minimizar el uso de mercurio.

**Procesamiento del mineral:** Para extraer el oro, es necesario separarlo de otros minerales. En la minería de roca dura, esto implica triturar y moler la roca. En la minería aluvial, el oro generalmente ya se encuentra liberado en los sedimentos. Una vez

separado, el oro se concentra en una masa más pequeña mediante técnicas de gravedad u otros métodos, antes de proceder a la amalgamación. Sin embargo, en algunas operaciones no se concentra el mineral, sino que se aplica mercurio directamente a grandes cantidades de material. Este proceso, altamente dañino para el medio ambiente, se conoce como amalgamación de todo el mineral.

**Amalgamación:** En la recuperación aurífera, el mercurio funciona como medio de captura selectiva para las partículas de oro liberadas durante la molienda. Se combina con el oro formando una aleación maleable compuesta aproximadamente por un 50% de mercurio y un 50% de oro, conocida como «amalgama». Debido a su alto peso, la amalgama es fácil de separar y recolectar del resto de los materiales.

**Quema de la amalgama:** Al calentar la amalgama, el mercurio se volatiliza, mientras que el oro -junto a ciertas impurezas- permanece en estado sólido.

Los metales son elementos que existen de forma natural en el sistema. Sin embargo determinantes así como la dosis, la forma de exposición, las especies químicas, de igual manera la edad, el sexo, la composición genética y el estado nutricional de las personas expuestas a ellos, influyen en su nivel de toxicidad (Sable et al., 2024).

El uso de mercurio en la extracción de oro artesanal y en pequeña escala (ASGM, por sus siglas en inglés) ha captado la atención y la preocupación mundial durante décadas (Smith, 2019). Según estimaciones de 2010, en Perú se liberaron aproximadamente 70 toneladas de mercurio al medio ambiente debido a la minería artesanal y de pequeña escala de oro (MAPE), y se cree que esta cifra ha aumentado considerablemente desde entonces (GEF, 2018).

### **2.2.3 Condiciones ambientales del área de estudio**

#### **a. Clima y altitud**

El distrito de Ananea, ubicado en la zona alta de la cuenca del río Ramis, mantuvo por décadas un sistema económico tradicional sustentado en dos pilares: (i) la ganadería extensiva de camélidos (alpacas y llamas) como actividad principal, y (ii) una agricultura de altura complementaria, con cultivos resistentes a las condiciones altoandinas. Este modelo productivo convivía con una minería artesanal de carácter estacional. La coyuntura internacional 2000-2005 marcó un punto de inflexión cuando la escalada del

precio del oro reconfiguró abruptamente la matriz económica local, generando una migración laboral masiva hacia la minería aurífera y el abandono progresivo de las prácticas agropecuarias ancestrales (Avalos et al., 2024).

#### **b. Actividad extractiva en el área de estudio**

La minería a pequeña escala y artesanal opera como un pilar fundamental para el sustento y el desarrollo socioeconómico en las zonas más aisladas del Perú. Estas actividades no solo constituyen una fuente de ingresos esencial, sino que también funcionan como un mecanismo de inclusión social y reducción de la pobreza. En este contexto, el oro se consolida como el metal de mayor extracción (MINEM, 2024).

La cuenca del río Ramis ha experimentado diversos impactos y conflictos socioambientales derivados de las actividades de productores agrícolas, ganaderos y mineros, tanto formales como informales, que operan en zonas cercanas a la cordillera oriental, entre los 3,800 y 5,400 metros sobre el nivel del mar. Según un estudio realizado por Salas-Mercado, Hermoza-Gutiérrez & Salas-Ávila (2020), se evaluaron los parámetros fisicoquímicos y los niveles de contaminación en el río Crucero, próximo a la mina La Rinconada y al área de investigación. Los hallazgos revelaron que, durante la temporada seca, el pH del agua se ve alterado, lo que deteriora su calidad y la vuelve inapropiada para el consumo humano, además de propiciar la precipitación de metales. Asimismo, se identificaron elevadas concentraciones de arsénico, cadmio y zinc en los sedimentos del río.

En un estudio sobre la calidad del agua en la cuenca del Ramis, Olarte & Tanaka (2009) determinaron que, aunque los valores de pH y conductividad no disuelta (CND) se encuentran dentro de rangos permisibles en las zonas altas, estos parámetros incrementan progresivamente en las áreas bajas cercanas al lago Titicaca. La investigación detectó una notable contaminación por arsénico (As) y plomo (Pb) en las aguas, asociada principalmente a actividades mineras, pasivos ambientales y procesos de erosión litogénica. Asimismo, los sedimentos presentaron elevadas concentraciones de As, mercurio (Hg) y Pb, excediendo los límites establecidos por la USEPA. Esta situación podría estar alterando las funciones hidrológicas de la cuenca y perjudicando actividades productivas clave, como la agricultura y la ganadería, en la región (Avalos et al., 2024).

### **c. Factores que afectan la microbiota local**

La actividad extractiva artesanal ocasiona significativas afectaciones al medio ambiente mediante la introducción y dispersión de elementos metálicos tóxicos, especialmente el mercurio utilizado en los procesos de recuperación aurífera, situación que simultáneamente pone en riesgo la integridad física de los operarios mineros, por lo que resulta imperativo identificar los focos principales de polución mercurial y de otros compuestos metálicos contaminantes (Machaca, 2017).

El cambio climático por la actividad minera genera impactos críticos en la biodiversidad: estudios demuestran reducciones  $\geq 40\%$  en especies endémicas de ecosistemas impactados (Angon et al., 2024) junto con fragmentación de corredores biológicos y disrupción de redes tróficas por bioacumulación de metales. Paralelamente, induce degradación edáfica acelerada, con tasas de erosión y pérdida de microbiota del suelo, afectando especialmente biomas frágiles como páramos y bosques tropicales. Estos procesos comprometen servicios ecosistémicos clave, desde polinización hasta regulación hídrica, exigiendo estrategias de mitigación basadas en ecología de la restauración (Novoa et al., 2022).

En las comunidades ícticas, la concentración de mercurio total (THg) y metilmercurio (MeHg) varía según las características morfológicas de cada especie y su posición en la red trófica, lo que determina los procesos de bioacumulación que no solo comprometen la diversidad y equilibrio de los ecosistemas acuáticos al afectar diferentes niveles de la cadena alimentaria, sino que también representa una amenaza para la riqueza biológica marina y dulceacuícola, generando riesgos ambientales que se extienden hasta las poblaciones humanas que dependen de estos recursos pesqueros como fuente de alimentación (Pavithra et al., 2023).

#### **2.2.4 Exposición a metales pesados**

La extracción aurífera artesanal y a pequeña escala constituye una de las principales fuentes de liberación de mercurio a nivel mundial. Los riesgos para la salud humana en los lugares de trabajo revelan niveles inaceptables de peligro no cancerígeno, tanto en la estación lluviosa como en la seca. Según el índice de peligrosidad, el 75% de los trabajadores están expuestos a efectos adversos en sistemas clave como el nervioso, digestivo, respiratorio e inmunológico (Paz-Barzola et al., 2023).

El arsénico, el cromo, el cadmio, el mercurio y el plomo están entre los metales más relevantes que generan preocupación en la salud pública debido a su alta toxicidad. Estos elementos, presentes en vetas que contienen oro, son considerados toxinas de amplio espectro capaces de afectar múltiples órganos, incluso en concentraciones bajas (Sable et al., 2024).

#### **a. Evaluación de riesgo ambiental en relaves: Un modelo conceptual**

Para abordar el problema de la contaminación ambiental causada por un derrame de relaves, es fundamental establecer un modelo conceptual preciso del área afectada y su entorno. Este modelo debe representar de manera esquemática la situación, considerando los factores que influyen en la cadena de riesgos ambientales. Estos factores incluyen: (i) el origen de la contaminación, (ii) la identificación de los contaminantes relevantes, su distribución en el espacio y el tiempo dentro de los medios ambientales (aire, suelo y agua), así como sus características químicas (especiación), (iii) los procesos que facilitan su dispersión, (iv) las rutas a través de las cuales los contaminantes pueden entrar en contacto con los seres vivos, y (v) los receptores potenciales que podrían verse afectados (Cacciuttolo et al., 2023).

#### **2.2.5 Impacto ambiental de los relaves mineros**

En los países en desarrollo, millones de personas dependen de la minería artesanal y de pequeña escala de oro (MAPE) como medio de subsistencia. No obstante, esta actividad implica un alto costo. La MAPE está asociada con diversos problemas de salud laboral y daños ambientales, especialmente cuando se lleva a cabo de forma informal o con limitaciones en recursos materiales y técnicos. Estas condiciones perjudican la salud y el bienestar de los mineros, sus familias y las comunidades cercanas (Organización Mundial de la Salud, 2017).

La minería es considerada una actividad que ocasiona impactos ambientales de gran magnitud. Esta concepción se sustenta, en primer término, en la existencia de diversos pasivos ambientales originados por operaciones mineras del pasado, desarrolladas en un marco regulatorio deficiente, y que, hasta la actualidad, no han sido objeto de remediación. En segundo lugar, esta visión se refuerza por la persistencia de prácticas inadecuadas y retos actuales asociados a la gestión de los impactos ambientales derivados de las operaciones mineras en curso o de las actividades de exploración. A lo anterior, se

suman los considerables daños ambientales provocados por la minería ilegal e informal, lo que agrava aún más la problemática (Comisión para el desarrollo minero sostenible, 2020).

El peligro asociado a la gestión inadecuada de relaves mineros deriva de dos factores críticos: (1) las deficiencias en su manejo integral (incluyendo etapas de confinamiento, recolección, transporte y tratamiento), y (2) la presencia de elementos altamente tóxicos en su composición, como arsénico (As), cadmio (Cd), cobre (Cu), plomo (Pb), mercurio (Hg), cromo (Cr), selenio (Se) y zinc (Zn). Estos metales y metaloides, conocidos por su persistencia ambiental y bioacumulación, exacerbando la peligrosidad de los relaves, incrementando su capacidad para generar impactos contaminantes a largo plazo en los ecosistemas y la salud pública (Cacciuttolo et al., 2023).

#### **a. Contaminación del suelo y agua**

En el Perú, la interacción entre la mineralogía andina y la explotación minera intensiva promueve la lixiviación y transporte de metales pesados hacia sistemas acuáticos. Su alta movilidad geoquímica y persistencia ambiental facilita su ingreso a cadenas tróficas y redes de abastecimiento de agua, generando un ciclo de contaminación difusa con efectos acumulativos en ecosistemas y poblaciones humanas (Villena-Chávez, 2018).

La acumulación de metales pesados provenientes de relaves degrada la calidad edáfica, disminuyendo la fertilidad del suelo y limitando su función como sustrato vital para la flora (Tchernitchin & Herrero, 2006).

Los residuos generados por la actividad minera, particularmente los relaves, presentan una persistencia ambiental debido a su escasa o nula degradación natural. Estos desechos contienen metales pesados y compuestos químicos de elevada toxicidad, los cuales se dispersan en los cuerpos de agua superficiales y acuíferos, alterando su calidad y afectando los ecosistemas terrestres y acuáticos adyacentes. La peligrosidad de estos contaminantes radica en su alta movilidad en medios hídricos y su capacidad de bioacumulación, lo que incrementa su impacto nocivo sobre la biodiversidad y, potencialmente, sobre la salud humana a través de la exposición directa o el consumo de agua contaminada (Brousett-Minaya et al., 2021; Menéndez & Muñoz, 2021).

### **2.2.6 Efectos sobre la biodiversidad microbiana**

En presencia de condiciones ambientales específicas, el mercurio (Hg) liberado a los ecosistemas puede sufrir metilación, generando metilmercurio (MeHg), una forma orgánica altamente tóxica y persistente. Este compuesto se incorpora a los sistemas acuáticos, donde ocurre bioacumulación: organismos de niveles tróficos superiores (p. ej., peces depredadores) ingieren presas contaminadas, incrementando progresivamente las concentraciones de MeHg a lo largo de la cadena alimentaria.

### **2.2.7 Potencial de los microorganismos nativos para la biorremediación**

La biorremediación es una tecnología emergente que utiliza microorganismos, plantas o enzimas para degradar o neutralizar contaminantes en los relaves mineros.

Esta técnica es especialmente relevante en la minería, donde los relaves contienen metales pesados y otros contaminantes que pueden afectar gravemente los ecosistemas y la salud humana (Ramírez & Cadena, 2023).

#### **a. Adaptación a condiciones extremas**

Las bacterias psicrófilas, reconocidas como uno de los principales microorganismos descomponedores, comprenden diversas especies capaces de desarrollarse en condiciones de frío (Liang et al., 2022; Murphy et al., 2016). Este grupo incluye géneros como *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Lactococcus*, *Microbacterium* y *Serratia* (Belmar & Alfonso, 2018). Un aspecto crítico es su capacidad para sintetizar enzimas termorresistentes (proteasas y lipasas), las cuales conservan su actividad incluso tras procesos de esterilización (Xu et al., 2024).

La diversidad microbiana incluye microorganismos con diferentes capacidades frente a los metales: los resistentes, que poseen mecanismos genéticos de detoxificación activados por la presencia del metal, y los tolerantes, que no se ven afectados por su presencia o ausencia. Ambos tipos presentan especial relevancia en biorremediación, ya que pueden ser empleados eficazmente para la extracción de metales en ambientes contaminados (Vullo, 2003).

Las bacterias han evolucionado múltiples estrategias de resistencia para contrarrestar la toxicidad de los metales (Silver & Phung, 2005). Estos mecanismos incluyen: (a) la captura de iones metálicos mediante componentes celulares que reducen su reactividad,

(b) la transformación enzimática de metales/metaloides a estados redox menos tóxicos, y (c) sistemas de transporte membranal que eliminan estos contaminantes del citoplasma (Machaca, 2017). Los avances en genómica han permitido identificar y caracterizar a profundidad los genes responsables del transporte de metales pesados, gracias al acceso a secuencias genómicas completas (Cervantes et al., 2006).

## **b. Rol en la mitigación de contaminantes**

La microbiología de sistemas acuáticos analiza las dinámicas ecológicas entre comunidades microbianas (bacterias, cianobacterias, hongos, protozoos, algas y virus) y su entorno hídrico. Estructuralmente, bacterias y cianobacterias son procariotas, mientras que otros microorganismos acuáticos (excepto virus) son eucariotas. La carga microbiana sirve como bioindicador de eutrofización, mostrando correlación positiva con aportes de nutrientes, como en aguas receptoras de efluentes cloacales (Marín, 2003). Como los organismos más abundantes en la Tierra, los microorganismos contribuyen considerablemente al cambio climático y se ven gravemente afectados por él. Si bien la amenaza del cambio climático es inminente, las conversaciones sobre su relación con los microorganismos aún son escasas fuera de la comunidad científica microbiana (American Society for Microbiology, 2022).

Los cuerpos de agua comúnmente albergan bacterias entéricas, microorganismos que habitan naturalmente el tracto intestinal humano y son excretados mediante heces fecales. Al ingresar al medio acuático, estas bacterias enfrentan condiciones ambientales adversas que limitan significativamente su capacidad de reproducción y supervivencia. Dado que los métodos tradicionales para su identificación y cuantificación resultan complejos y requieren tiempo considerable, en la práctica se emplean las bacterias coliformes como indicadores microbiológicos de contaminación fecal, principalmente por la mayor rapidez y facilidad de su detección en análisis de laboratorio (Craun & Calderon, 2001).

La microbiota acuática presenta una dicotomía ecológica: bacterias autóctonas (especializadas en el medio acuático) versus alóctonas (principalmente de origen terrestre). A estas se suman microorganismos depositados por aerosolización atmosférica. Mientras que las alóctonas muestran viabilidad transitoria, su persistencia prolongada puede inducir adaptaciones hacia un estado facultativo (Marín, 2003).

## **2.2.8 Aislamiento de microorganismos nativos**

### **a. Concepto y fundamentos del aislamiento microbiológico**

#### **Definición de aislamiento de microorganismos**

En los ecosistemas naturales, los microorganismos coexisten formando comunidades microbianas complejas, lo que se refleja en los llamados cultivos mixtos cuando son cultivados en laboratorio. No obstante, el estudio microbiológico riguroso requiere el trabajo con cultivos puros (axénicos), donde solo está presente un único tipo microbiano. Aunque las técnicas moleculares modernas permiten cierta caracterización en muestras mixtas, la identificación bacteriana precisa y su caracterización exhaustiva solo pueden lograrse mediante el aislamiento y obtención de cultivos puros. Este proceso de aislamiento representa el primer y fundamental paso en el estudio bacteriológico, ya sea a partir de muestras clínicas, ambientales o alimentarias, permitiendo posteriormente el cultivo y mantenimiento de cepas puras para su análisis detallado.

El aislamiento microbiano es un procedimiento fundamental en microbiología que consiste en separar y purificar un microorganismo específico (bacteria, levadura u hongo) de una comunidad microbiana mixta. Este proceso permite obtener cultivos axénicos (poblaciones microbianas puras compuestas por un único tipo de organismo) esenciales para su caracterización e identificación precisa.

En el contexto de laboratorio, las muestras ambientales (agua, suelo, aire) o biológicas (tejidos, fluidos) presentan naturalmente una diversidad microbiana compleja. El aislamiento selectivo se hace necesario para analizar la composición microbiana de la muestra y recuperar microorganismos diana con fines de estudio o aplicación biotecnológica.

#### **Importancia del aislamiento en ambientes contaminados**

La presencia de altas concentraciones de metales, compuestos organoclorados o sales inorgánicas en un medio contaminado inhibe la eficiencia de los procesos de tratamiento biológico, debido a la toxicidad que estos contaminantes ejercen sobre los microorganismos degradadores. De esta manera, Covarrubias, García, & Peña (2015), aseguran que los metales pesados no pueden descomponerse por vía biológica, física o

química y la remediación de suelos contaminados con estos compuestos se limita a tratamientos que involucran la alteración de la solubilidad del metal, su toxicidad o su movilidad a través de cambios en su estado de valencia. En el caso de la biorremediación biológica, los procesos microbianos utilizados para la recuperación de suelos contaminados por metales incluyen bacterias (Vizúete-García et al., 2020).

Para el aislamiento de estos microorganismos a partir de muestras contaminadas, se requiere el empleo de medios de cultivo específicos.

Al aplicar una mayor diversidad de microorganismos el proceso resulta ser más eficiente en la degradación de estos compuestos (Rojas & Gárate, 2011). De esta manera, se determina el uso de otros organismos como hongos, algas, Cianobacterias y Actinomicetos para la degradación de estos compuestos tóxicos en el suelo (Arrieta et al., 2012).

Otro de los países dedicados a la producción y extracción de petróleo es México, en donde también se emplea la biorremediación con resultados regulares debido a problemas en la estimulación de las bacterias y del monitoreo continuo de los sitios (Ortíz et al., 2003).

## **b. Métodos para el aislamiento de microorganismos en relaves mineros**

### **Técnicas de muestreo y preparación de muestras**

La mayoría de los medios de cultivo disponibles comercialmente se presentan en forma liofilizada, requiriendo rehidratación previa a su uso. Su preparación generalmente consiste en pesar la cantidad adecuada del polvo liofilizado y disolverlo en agua destilada, siguiendo estrictamente las especificaciones del fabricante. Para los medios líquidos (caldos), la solución se esteriliza directamente bajo las condiciones indicadas. En el caso de medios sólidos que contienen agar, es necesario fundirlo previamente en baño maría antes de proceder a su esterilización final (Cervera, 2011).

Tras completar la esterilización en autoclave, los medios de cultivo deben enfriarse a temperatura ambiente. Para los medios sólidos en tubos, estos se inclinan durante el enfriamiento para obtener agar en pico cuando sea necesario. Simultáneamente, pueden prepararse placas petri vertiendo cuidadosamente el medio estéril aún fundido en su interior, realizando esta operación cerca de una llama para mantener condiciones

asépticas. Alternativamente, el medio estéril puede almacenarse solidificado en tubos, para ser fundido posteriormente en baño maría al momento de requerir la preparación de nuevas placas.

### **Cultivo en medios selectivos y diferenciales**

Los medios de cultivo son preparaciones de agua y nutrientes que favorecen el desarrollo microbiano, clasificándose en tres tipos principales para microbiología clínica: los medios nutritivos, que permiten el crecimiento de diversos microorganismos sin discriminación; los medios diferenciales, que además de soportar el crecimiento de múltiples bacterias incorporan sustancias indicadoras (como sangre o azúcares) que generan características visuales distintivas entre especies; y los medios selectivos, diseñados para favorecer específicamente ciertos grupos microbianos. Esta clasificación proporciona herramientas esenciales para el aislamiento e identificación bacteriana en laboratorios de diagnóstico (American Society for Microbiology, 2022).

Los medios de cultivo básicos, como el agar sólido o los caldos líquidos, pueden complementarse con nutrientes especializados (aminoácidos, vitaminas, factores de crecimiento) para satisfacer los requerimientos nutricionales de microorganismos particulares. Entre estos medios enriquecidos, los selectivos destacan por su capacidad de promover exclusivamente el desarrollo de especies microbianas específicas, inhibiendo simultáneamente el crecimiento de otros organismos no deseados.

**Tabla 1**

*Composición del medio de cultivo Agar nutritivo.*

<b>Constituyente</b>	<b>Cantidad (g/L)</b>
Pluripeptona	5.0
Extracto de carne	3.0
Cloruro de sodio	8.0
Agar	15.0

*Nota.* Los componentes se prepararon de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Himedia). Adaptado de Arenas Delgado, (2018).

**Tabla 2**

*Composición del medio de cultivo Agar Infusión Cerebro-Corazón*

<b>Constituyente</b>	<b>Cantidad (g/L)</b>
Infusión cerebro de ternera	200.0
Infusión de corazón	250.0
Peptona	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Glucosa	2.0
Fosfato disódico	2.5
Agar	15.0

*Nota.* Los componentes se prepararon de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Merck). Adaptado de Arenas Delgado, (2018).

**Tabla 3**

*Composición del medio de cultivo Agar Sangre.*

<b>Constituyente</b>	<b>Cantidad (g/L)</b>
Infusión de musculo de corazón	375.0
Peptona	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Agar	15.0

*Nota.* Los componentes se prepararon de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Himedia). Adaptado de Arenas Delgado, (2018)

### **Aislamiento de bacterias y hongos resistentes a metales pesados**

Los microorganismos resistentes o tolerantes a metales pesados tienen al menos tres aplicaciones biotecnológicas documentadas: 1) procesos de biominería mediante técnicas de biolixiviación, 2) estrategias de biorremediación ambiental a través de mecanismos de biosorción, y 3) desarrollo de biosensores de contaminación basados en sus genes y proteínas reguladoras de resistencia (Nies, 1999).

La biosorción microbiana representa un mecanismo de remediación ambiental donde microorganismos (aislados o en comunidad) inmovilizan metales mediante procesos

de bioadsorción, bioprecipitación o acumulación intracelular. Sus implementaciones industriales abarcan desde el tratamiento de efluentes hasta la biominería.

### **c. Factores que afectan el aislamiento en ambientes mineros**

#### **Influencia de la toxicidad del medio**

La toxicidad de metales pesados en sistemas acuáticos está regulada por un triángulo de factores: concentración-duración de exposición-característica ambiental. Su análisis requiere un enfoque multinivel que considere: (i) especiación química ambiental, (ii) procesos de biointerfase (absorción/efectos fisiológicos secundarios), y (iii) farmacocinética intracelular (distribución subcelular y mecanismos de acción tóxica) (Castañé et al., 2003).

Numerosos organismos han desarrollado capacidad de adaptación a condiciones ambientales adversas como estrategia de supervivencia y perpetuación de su especie. Entre los entornos más hostiles creados recientemente destaca la contaminación ambiental, producto del exceso de producción y manejo inadecuado de materiales antropogénicos. Los cuerpos de agua representan un claro ejemplo de estos ecosistemas impactados. Esta contaminación ha actuado como fuerza selectiva sobre comunidades microbianas, favoreciendo el desarrollo de diversos mecanismos de adaptación que les permiten prosperar en estos ambientes alterados (Moreno et al., 2022).

#### **Adaptaciones microbianas a condiciones extremas**

La biosfera incluye nichos ambientales con estrés abiótico severo, donde factores como la temperatura, el pH, la salinidad, la presión o la disponibilidad de agua superan los umbrales compatibles con la vida para la mayoría de las especies (Belmar & Alfonso, 2018).

Los extremófilos, particularmente procariotas, desarrollan adaptaciones únicas para hábitats límite. Los psicrófilos, especializados en bajas temperaturas, son ecológicamente cruciales al dominar los extensos ambientes fríos de la biosfera, donde cumplen roles metabólicos esenciales.

Los microorganismos extremófilos se clasifican según el factor ambiental abiótico predominante en su hábitat (termófilos, halófilos, acidófilos, etc.). Además, en ambientes naturales, estos organismos frecuentemente están expuestos a la acción simultánea de

múltiples factores de estrés extremo, lo que define nichos de poliextremofilia. A los microorganismos que presentan adaptaciones moleculares y fisiológicas que les permiten sobrevivir y/o desarrollar sus ciclos de vida en ambientes sometidos a la acción combinada de varios de estos determinantes ambientales extremos, se le denomina microorganismos poliextremófilos (Belmar & Alfonso 2018).

Bacterias gram negativas de los géneros *Moraxella*, *Moritella*, *Palaromonas*, *Polaribacter*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Psychroflexus* y *Vibrio* y algunas Gram positivas pertenecientes a los géneros *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Micrococcus* y *Planococcus* constituyen, entre otros, algunos géneros que presentan bacterias psicrófilas (Belmar & Alfonso, 2018).

## **2.2.9 Caracterización molecular de microorganismos nativos**

### **a. Fundamentos de la caracterización molecular**

#### **Principios de la extracción de ADN microbiano**

El estudio del ADN destaca como un campo ideal para integrar las relaciones Ciencia-Tecnología-Sociedad (CTS) en la enseñanza, ya que sus aplicaciones biotecnológicas, así como el desarrollo de cultivos transgénicos con mayor valor nutricional o resistencia a condiciones ambientales extremas, los avances en diagnóstico médico y terapia génica, la producción de fármacos mediante organismos modificados, y las técnicas de biorremediación ambiental, tienen un impacto directo en la vida cotidiana (Gutlerner, 2015). Estas innovaciones, frecuentemente difundidas en los medios de comunicación, demuestran cómo la ingeniería genética trasciende el laboratorio para influir en la agricultura, la salud, la industria y la conservación ecológica, reforzando así la importancia de su comprensión desde un enfoque científico y social (Marcos-Merino et al., 2019).

#### **Técnicas de amplificación genética (PCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica diseñada para amplificar secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de cebadores y una ADN polimerasa termoestable. La combinación de este descubrimiento con el desarrollo de la química fluorescente y la incorporación de la transcripción reversa sentó las bases técnicas para la creación de la qPCR o PCR cuantitativa en tiempo real (Devlin, 2021).

El objetivo principal de la qPCR es identificar, distinguir y cuantificar de manera precisa secuencias específicas de ácidos nucleicos presentes en una muestra. Esto se logra mediante el monitoreo en tiempo real de la amplificación, detectando la señal fluorescente que emite la reacción, ya que el aumento de la fluorescencia es directamente proporcional a la acumulación del producto amplificado. Debido a su precisión y versatilidad, esta técnica tiene aplicaciones en una amplia gama de campos, como las ciencias básicas, la biotecnología, el diagnóstico clínico y la investigación médica (Rodríguez Rodríguez et al., 2021).

La técnica de secuenciación del gen ARNr 16S se empleó por primera vez para su uso en el análisis filogenético en 1985 (Lane et al., 1985). Esta secuencia contenía diez "regiones altamente conservadas" para el diseño de cebadores y nueve "regiones hipervariables" que luego podrían usarse para identificar características filogenéticas de microorganismos. Las regiones conservadas reflejan las relaciones filogenéticas entre especies bacterianas y los cebadores de amplificación universales pueden diseñarse en función de sus secuencias, mientras que las regiones altamente variables reflejan las diferencias entre especies bacterianas. Los genes ARNr 16S bacterianos contienen nueve "regiones hipervariables" (V1-V9) que demuestran una considerable diversidad de secuencia entre diferentes bacterias. Específicamente, V1 diferencia mejor entre *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus sp. coagulasa negativo*, V2 y V3 pueden distinguir todas las especies bacterianas a nivel de género, V6 puede distinguir entre la mayoría de las especies bacterianas excepto *Enterobacteriaceae* y se encontró que V4, V5, V7 y V8 eran mínimamente efectivos como objetivos para sondas específicas de género o especie (Chakravorty et al., 2007; Torres, 2021). Los cebadores universales se pueden diseñar en función de sus secuencias y, por lo tanto, pueden servir para identificar y clasificar bacterias. Como el ARNr 16S puede distinguir entre diferentes especies, desempeña un papel importante en la taxonomía y el desarrollo bacteriano. Por lo tanto, la secuenciación del gen ARNr 16S se ha convertido en el gen marcador más utilizado para perfilar las comunidades bacterianas (Chakravorty et al., 2007; Yang et al., 2016).

La primera generación de tecnología de secuenciación, representada por el método de terminación de cadena de didesoxinucleótidos de Sanger y el método de degradación química de Maxam, se realizó en 1977 y permitió la primera identificación completa de la secuencia genómica del bacteriófago phi X174 (Sanger et al., 1977). Estas tecnologías se denominaron colectivamente la tecnología de secuenciación de primera generación

(Eren et al., 2023; Slatko et al., 2011). Más recientemente, se ha desarrollado una serie de tecnologías HTS de segunda generación, como la plataforma de secuenciación 454 de Roche, la plataforma Solexa Genome Analyzer de Illumina y la plataforma de secuenciación sólida de Applied Biosystems (ABI) (Hu et al., 2021; Meslier et al., 2022). En comparación con las tecnologías de secuenciación de primera generación, el mayor rendimiento de HTS ha demostrado ser más eficaz para su uso en la investigación genómica microbiana y se ha convertido rápidamente en el principal método de detección para la genómica microbiana (Budowle et al., 2014). En la actualidad, la principal entidad de investigación en microbiología forense es el 16S rDNA. Los procedimientos involucrados con el uso del 16S rDNA incluyen la extracción de ADN microbiano, plantillas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para regiones de alta variabilidad del 16S rDNA, construcción de bibliotecas, preparación de plantillas, secuenciación automática y análisis bioinformático de datos de secuenciación (Bador et al., 2020). HTS y las tecnologías de secuenciación genómica han revolucionado el campo de la microbiología, ya que permiten un estudio detallado de los microorganismos, lo que lleva a una rápida expansión de los datos biológicos (Yang et al., 2024).

Los avances en la tecnología de secuenciación de ácidos nucleicos han permitido ampliar nuestra capacidad para perfilar la diversidad microbiana, ya que puede proporcionar un medio para evaluar la generación de perfiles de comunidades microbianas para cientos e incluso miles de muestras. Normalmente, sería difícil extraer información significativa de estos grandes conjuntos de datos; sin embargo, este problema se ha resuelto en gran medida con la reciente aplicación del aprendizaje automático para este análisis microbiano (Ghannam & Techtmann, 2021). En el aprendizaje automático, se suministra a una computadora un conjunto de datos y los resultados asociados. Luego, la computadora "aprende" y genera un algoritmo que describe la relación entre el conjunto de datos suministrado y los resultados asociados. Al desarrollar algoritmos que mejor representen un conjunto de datos. El algoritmo puede codificarse explícitamente utilizando características conocidas, el aprendizaje automático utiliza subconjuntos de datos para generar un algoritmo que puede utilizar combinaciones novedosas o diferentes de características y pesos que las que se pueden derivar de los primeros principios. Este algoritmo puede utilizarse para inferencias que involucran futuros conjuntos de datos (Choi et al., 2020).

## **b. Identificación y análisis genético de microorganismos**

La secuenciación genómica, cuyo desarrollo se fundamentó en el descubrimiento del ADN como molécula portadora de la información hereditaria, ha evolucionado hasta convertirse en una tecnología transformadora para la ciencia moderna, ya que provee: datos genéticos completos a nivel molecular, aplicaciones revolucionarias en medicina (diagnóstico genético, terapias dirigidas), agricultura (mejoramiento de cultivos) y ecología (estudios de biodiversidad), y la capacidad de integrar información genómica con otros datos biológicos (enfoque multiómico), lo que ha redefinido nuestra comprensión de los sistemas biológicos y abierto nuevas fronteras en la investigación científica (Valderrama et al., 2020).

Los métodos pioneros de secuenciación marcaron un hito en la Biología Molecular, no solo impulsando avances conceptuales fundamentales, sino también sentando las bases tecnológicas para el surgimiento de plataformas de secuenciación de última generación. Este desarrollo metodológico catalizó la emergencia de disciplinas ómicas innovadoras, particularmente la Genómica (estudio integral de genomas) y la Transcriptómica (análisis sistemático de la expresión génica), que hoy constituyen pilares esenciales en la investigación biomédica y biotecnológica (Valderrama et al., 2020).

### **Secuenciación de genes marcador (16S rRNA, ITS)**

El ARN ribosómico 16S (ARNr 16S) es la macromolécula más empleada en investigaciones de filogenia y taxonomía bacteriana. Su uso como marcador molecular fue sugerido por Carl Woese (Universidad de Illinois) a principios de los años 70 (Olsen & Woese, 1993). Los trabajos de Woese llevaron a la clasificación de los procariotas en dos grandes grupos o reinos: Eubacteria y Archaeobacteria, cuya separación evolutiva es tan significativa como la que existe entre estos y los eucariotas (Woese, 1987). Más adelante, Woese propuso el término "dominio" para reemplazar al concepto de reino como la categoría taxonómica de mayor jerarquía, organizando los organismos celulares en tres dominios: Bacteria, Archaea y Eukarya, este último incluyendo a todos los seres eucariotas. Desde entonces, el estudio del ARNr 16S ha sido ampliamente utilizado para determinar relaciones filogenéticas en el ámbito procariota, generando un gran impacto en la comprensión de la evolución y, en consecuencia, en los sistemas de clasificación e identificación bacteriana (Rodicio & Del Carmen Mendoza, 2004).

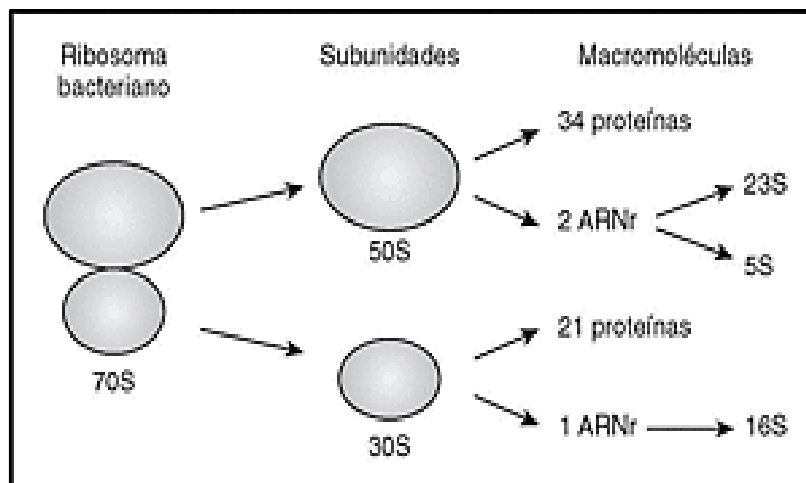
El ARN ribosómico 16S (ARNr 16S) puede analizarse mediante secuenciación parcial a través de la técnica de catalogación de oligonucleótidos. Este método consiste en tratar el ARNr 16S, previamente marcado in vivo y purificado, con la enzima ribonucleasa. Los fragmentos obtenidos se separan y luego se secuencian aquellos que contengan un mínimo de seis nucleótidos (nt). Posteriormente, las secuencias de estos fragmentos, provenientes de distintas bacterias, se alinean y comparan utilizando software bioinformático para determinar coeficientes de asociación. No obstante, en la actualidad este enfoque ha sido reemplazado por la secuenciación directa del gen que codifica el ARNr 16S (Rodicio & Del Carmen Mendoza, 2004).

## Ribosomas

Son estructuras celulares altamente especializadas encargadas de llevar a cabo el complejo proceso de síntesis proteica. En las bacterias, el ribosoma (Figura 1) presenta un coeficiente de sedimentación de 70S (en unidades Svedberg) y está compuesto por dos subunidades: una mayor (50S) y una menor (30S). Cada una de estas subunidades está formada por un conjunto de proteínas ribosómicas y moléculas de ARN ribosomal (ARNr) específicas (Pierce, 2009; Porres, 2020).

**Figura 1**

*Composición del ribosoma bacteriano (70S).*



*Nota.* División en sus dos subunidades principales y, a su vez, enumerando los componentes macromoleculares de cada una. Tomado de Tsukuda et al., (2017).

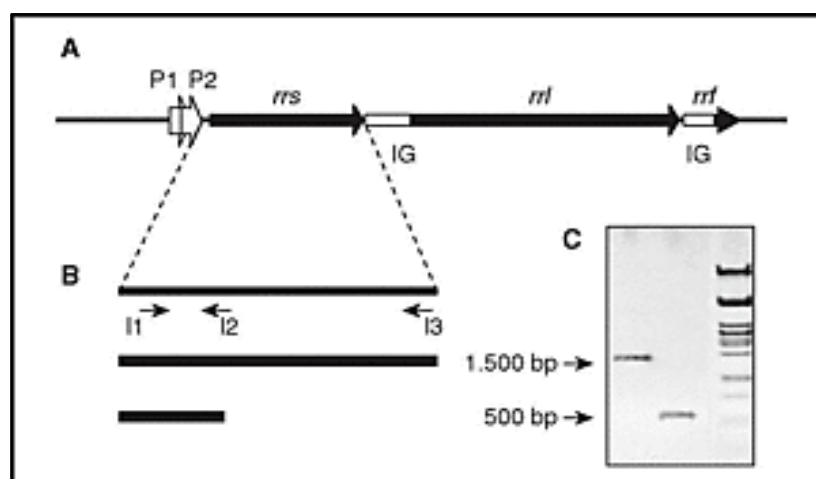
Las bacterias comprenden uno de los principales grupos de microorganismos y, dentro de las bacterias, hay tres tipos principales de ARN ribosómicos (ARNr), 5S (rrf), 16S (rrs) y 23S (rrl) (Tsukuda et al. 2017). Entre estos, el ARNr 16S es una pequeña subunidad

del ARN ribosómico bacteriano y el gen codificante para esta subunidad es el ADN ribosómico 16S (ADNr). La longitud total del ARNr 16S es de aproximadamente 1540 nt y está presente en los ribosomas de todas las bacterias. Debido a su estructura y función altamente conservadas, el HTS se utiliza a menudo en la investigación de la ecología microbiana para determinar sus fragmentos genéticos (Tozzo et al., 2020). Después de la secuenciación, las regiones 16S pueden analizarse bioinformáticamente. El grado de similitud en la secuenciación refleja la lejanía de las relaciones filogenéticas microbianas, mientras que la abundancia de microorganismos correspondientes en la comunidad se indica mediante el número de ocurrencias de la secuencia (Rodicio & Del Carmen Mendoza, 2004; M.-Q. Yang et al., 2024). De esta manera, es posible obtener información sobre la proporción de la composición de especies y la diversidad dentro de las comunidades microbianas (Hassler et al., 2022; Johnson et al., 2019).

La transcripción de estos operones inicia desde dos promotores (P1 y P2) localizados antes del gen *rrs*, produciendo un transcrito primario que es procesado por la ARNasa III mediante cortes específicos para liberar los ARNr maduros, los ARNt (cuando están presentes) y las regiones espaciadoras, permitiendo así una expresión coordinada de los componentes esenciales para la síntesis proteica (Rodicio & Del Carmen Mendoza, 2004).

## Figura 2

*Esquema de la organización de un operón de ARN ribosomal.*

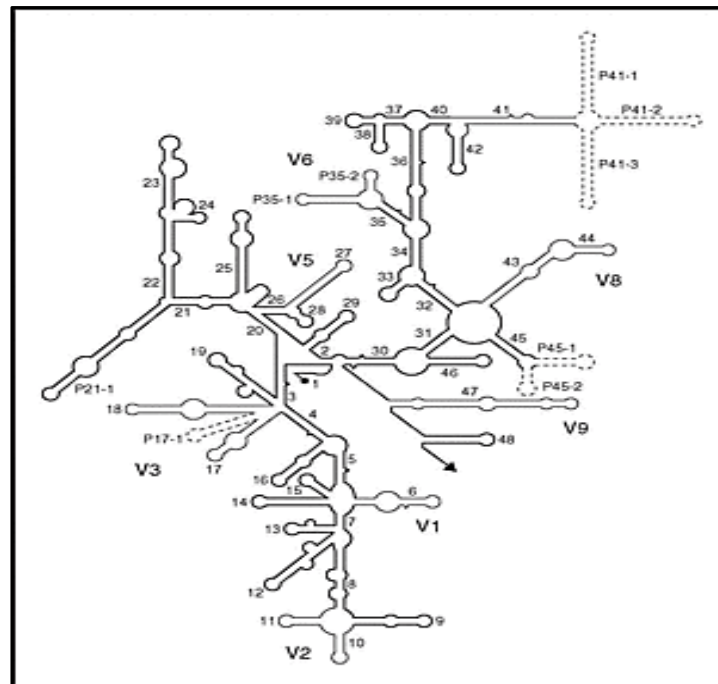


*Nota.* Los cebadores P1 y P2 utilizados en PCR para amplificar el gen (16S ARNr), usando marcadores clave para identificación de especies (*rri*, *rrs*, IG). Tomado de Valenzuela González et al., (2015).

El ARNr 16S es un polirribonucleótido de unos 1.500 nucleótidos codificado por el gen rrs (ADNr 16S), cuya secuencia proporciona información clave para estudios filogenéticos y taxonómicos (Valenzuela González et al., 2015). Como todo ARN de cadena sencilla, adopta una estructura secundaria con zonas de doble hélice alternadas con regiones no apareadas (Figura 2). En eucariotas, su equivalente funcional es el ARNr 18S, y ambos se denominan ARNr SSU (small subunit ribosomal RNA) por pertenecer a la subunidad pequeña del ribosoma. Estas moléculas muestran alta conservación evolutiva, con regiones universales en todos los organismos, pero también presentan segmentos variables en áreas específicas que permiten diferenciación taxonómica.

### Figura 3

*Representación esquemática de la cadena lineal del ARNr 16S.*



*Nota.* Se describe en su forma tridimensional compleja, como marcador filogenético en la identificación molecular. Tomado de Church et al., (2020)

La secuenciación dirigida de amplicones ha sido tradicionalmente empleada en Microbiología para identificar bacterias y hongos mediante la amplificación de regiones genómicas universales. En el caso de las bacterias, se utilizan segmentos del gen que codifica la subunidad ribosómica 16S (Church et al., 2020), mientras que, para los hongos, se analizan regiones del ADN espaciador entre los genes de las subunidades ribosómicas o zonas del gen que codifica la subunidad ribosómica 18S (Iwen et al., 2002).

La secuenciación Sanger, conocida por su alta precisión y baja tasa de error, sigue siendo una técnica ampliamente empleada tanto en estudios taxonómicos como en el diagnóstico etiológico (López et al., 2021) La secuenciación didesoxi de Sanger es vital en el análisis clínico debido a su precisión, capacidad para analizar marcadores genéticos como SNP y STR , capacidad para generar perfiles de ADN confiables (Al-Shuhaib y Hashim 2023). De acuerdo a los principios esquemáticos del método de secuenciación Sanger, la secuencia de ADN se determina mediante la síntesis de una cadena complementaria de ADN. Este proceso se lleva a cabo utilizando una enzima llamada ADN polimerasa, una cadena de ADN plantilla que sirve como guía, y un cebador (Men et al. 2008).

### **Análisis filogenético y taxonómico**

La filogenómica consiste en analizar genomas completos para inferir las relaciones evolutivas entre microorganismos. Este enfoque, combinado con otros métodos mencionados previamente, resulta valioso en la investigación de brotes, ya que si los aislados sospechosos se agrupan en un clado monofilético, se puede deducir que provienen de un ancestro común (López et al., 2021).

## **c. Herramientas bioinformáticas para el análisis molecular**

### **Bases de datos genéticas**

El genoma bacteriano abarca todo el material genético de una bacteria, incluyendo su cromosoma circular de doble hebra y los elementos extracromosómicos adquiridos. Este genoma presenta variaciones no solo entre especies diferentes, sino incluso entre individuos de una misma especie, lo que da lugar a diversos fenotipos.

La reproducibilidad genómica, definida como la capacidad de las herramientas bioinformáticas para mantener resultados consistentes entre réplicas técnicas, es esencial para avanzar en el conocimiento científico y las aplicaciones médicas. En primer lugar, examinamos distintas interpretaciones de la reproducibilidad en genómica para aclarar los términos. Posteriormente, discutimos el impacto de las herramientas bioinformáticas en la reproducibilidad genómica y exploramos métodos para evaluar estas herramientas en cuanto a su eficacia para garantizar la reproducibilidad genómica (Baykal et al., 2024).

## **Software para análisis filogenético**

La filogenómica comienza con un alineamiento de secuencias, típicamente obtenido por mapeo contra una referencia, cuya calidad es fundamental para la validez de los resultados. Para asegurar un alineamiento correcto, se utilizan herramientas como AliView (Larsson, 2014) para visualización y edición, GBlocks o TrimAl (Castresana, 2000; Di Franco et al., 2019), algunas que nos permiten detectar la presencia de secuencias erróneas o mal alineadas, como evalmsa (Chiner-Oms & González-Candelas, 2016) para detectar secuencias erróneas. Tras validar los alineamientos, se genera un archivo multiFasta con secuencias de igual longitud, preferiblemente equivalentes al genoma de referencia, aunque frecuentemente se construyen secuencias consenso con solo las posiciones cubiertas en todos los aislados. La construcción del árbol filogenético puede realizarse con programas como MegaX (<https://www.megasoftware.net/>) o IQTree (<http://www.iqtree.org/>), este último más complejo pero con mejores resultados, y los árboles resultantes pueden visualizarse con herramientas como FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) (López et al., 2021).

### **d. Aplicación de la caracterización molecular en bioremediación**

#### **Relación entre la genética y el potencial funcional**

La acción humana está alterando la biodiversidad en los ecosistemas, aunque aún se desconocen las consecuencias precisas de estos cambios en los procesos ecológicos. Algunos investigadores sugieren que la estabilidad de los ecosistemas podría depender del número de especies presentes. En este contexto, las comunidades microbianas desempeñan un rol fundamental debido a su elevada abundancia, diversidad metabólica y alta actividad enzimática. Se presume que la diversidad microbiana afecta la productividad, estabilidad y capacidad de recuperación (resiliencia) de los ecosistemas ante perturbaciones antropogénicas o climáticas; sin embargo, aún no se comprende plenamente esta relación con funciones ecológicas clave (Torsvik & Øvreås, 2002).

A diferencia de los estudios en macroorganismos, los análisis experimentales sobre la estructura de comunidades microbianas naturales y su influencia en procesos ecosistémicos son limitados (Prosser et al., 2007). Esta brecha se explica, en parte, porque los mecanismos que rigen la ecología microbiana actúan a escalas espaciales mucho más reducidas (Dhakar & Pandey, 2016).

## **Importancia para el desarrollo de biotecnologías ambientales**

Los microorganismos del suelo que sobreviven en los sitios contaminados por la minería han desarrollado una resistencia a los metales presentes, de tal manera que se llegan a biotrasformarlos. La presencia de estos pueden mejorar la eficiencia de la fitorremediación reduciendo la toxicidad de los metales y promoviendo también el crecimiento de plantas (Navas et al., 2021).

La biorremediación es una tecnología emergente que utiliza microorganismos, plantas o enzimas para degradar o neutralizar contaminantes en los relaves mineros. Esta técnica es especialmente relevante en la minería, donde los relaves contienen metales pesados y otros contaminantes que pueden afectar gravemente los ecosistemas y la salud humana.

## **Normatividad ambiental en relaves**

El presente apartado tiene por finalidad revisar y analizar el marco normativo ambiental peruano vigente que regula la gestión de los Pasivos Ambientales Mineros (PAM), así como el acceso a los recursos de la diversidad biológica. Esto permite enmarcar la presente investigación dentro de los lineamientos legales del Perú, destacando su relevancia en el contexto de la remediación ambiental y la bioprospección de microorganismos.

De conformidad con lo establecido en la Constitución Política del Perú (1993), el artículo 2°, inciso 22, reconoce el derecho de toda persona a gozar de un ambiente equilibrado y adecuado para el desarrollo de su vida. Asimismo, el artículo 67° establece que el Estado es el responsable de determinar la política nacional del ambiente y promover el uso sostenible de los recursos naturales.

La Ley N° 28271, Ley de Pasivos Ambientales Mineros, constituye el marco legal que define la naturaleza de un Pasivo Ambiental Minero (PAM). Asimismo, dispone la obligatoriedad de crear y mantener un Inventario Nacional de estos pasivos y establece el régimen legal para su gestión, remediación y financiamiento.

De acuerdo al Decreto Supremo N° 059-2005-EM, que aprueba el Reglamento de la Ley N° 28271, Ley de Pasivos Ambientales Mineros, establece el marco procedimental para la gestión integral de los Pasivos Ambientales Mineros (PAM). Este instrumento normativo desarrolla de manera específica los procesos de identificación, registro,

categorización y remediación de los PAM, detallando los requisitos, plazos y responsabilidades aplicables. El objetivo de esta normativa es mitigar o eliminar los riesgos que estas instalaciones representan para la salud pública y el medio ambiente. Conforme a la ley, se define como pasivo ambiental minero toda instalación, efluente o depósito de residuos proveniente de operaciones mineras abandonadas o inactivas que constituye un riesgo permanente. El reglamento desarrolla el alcance de la ley, especificando los procedimientos técnicos y administrativos para su gestión, que incluyen la elaboración del inventario nacional y la ejecución de proyectos de remediación.

El Decreto Supremo N° 031-2023-EM, que desarrolla la Ley N° 31211, establece la obligatoriedad de que las empresas del sector minero-metalúrgico adecúen sus procesos de transporte y disposición final de relaves, con el objetivo de garantizar una gestión segura y ambientalmente responsable de los residuos generados por sus operaciones.

El Decreto Supremo N° 040-2014-EM, que aprueba el Reglamento de Protección y Gestión Ambiental para las Actividades Mineras, establece en su De conformidad con el Artículo 20°, se establece la obligación de identificar y gestionar de manera integral los aspectos ambientales, así como los factores y riesgos inherentes a las operaciones mineras que puedan generar impactos significativos sobre el medio ambiente. Dicha disposición enfatiza la implementación de medidas específicas dirigidas a la protección de los recursos naturales, entre ellos: agua, aire, suelo, flora y fauna. Asimismo, prescribe el control de agentes contaminantes y molestias, como ruido, vibraciones y radiaciones ionizantes, junto con la gestión adecuada en la manipulación, almacenamiento, tratamiento y disposición final de sustancias químicas y residuos, tanto industriales como domésticos. Asimismo, el Artículo 48° del mismo reglamento exige que el Plan de Manejo Ambiental (PMA) incluya medidas técnicas de cumplimiento obligatorio orientadas a prevenir, mitigar y controlar los impactos ambientales. Esto comprende específicamente el manejo de residuos sólidos industriales (como escorias, desmontes, relaves y otros residuos de procesos mineros) y el manejo de residuos domésticos no municipales.

De acuerdo con la "Guía para la Fiscalización Ambiental a la Pequeña Minería y Minería Artesanal" (2016), el manejo de residuos sólidos industriales, incluidos los desmontes y

relaves generados en los procesos mineros, corresponde a las competencias del Gobierno Regional (GORE) y la Dirección General de Asuntos Ambientales (DGAM).

De conformidad con el Reglamento de la Ley N° 27314 - Ley General de Residuos Sólidos, aprobado mediante Decreto Supremo N° 057-2004-PCM, los pequeños productores mineros y productores mineros artesanales están obligados a realizar una disposición adecuada de los residuos que generen, conforme a la normativa ambiental vigente y, cuando corresponda, a sus programas de adecuación y manejo ambiental. En este marco legal, deben elaborar una Declaración de Manejo de Residuos Sólidos utilizando el formulario del Anexo N° 1 del mencionado reglamento, la cual debe ser presentada ante el Gobierno Regional (GORE) o la Dirección General de Minería (DGM).

De acuerdo con el Decreto Supremo N° 01-2010-AG, que reglamenta la Ley de Recursos Hídricos N° 29338, el Artículo 132° establece la siguiente clasificación para las aguas residuales: Las aguas residuales domésticas se definen como los efluentes generados en entornos residenciales, comerciales e institucionales, cuya composición incluye excretas humanas y otros subproductos derivados de las actividades cotidianas de la población. Por su parte, las aguas residuales municipales constituyen un caudal de naturaleza predominantemente doméstica que puede incorporar, de manera puntual o permanente, aportes de drenaje pluvial o descargas de origen industrial. El marco normativo peruano, específicamente el Artículo 132° del DS N° 001-2010-AG, conceptualiza las aguas residuales domésticas como los efluentes generados en los ámbitos residencial, comercial e institucional, los cuales contienen tanto desechos de origen fisiológico como otros resultantes de las actividades antrópicas.

De acuerdo con la Ley N° 28611 - Ley General del Ambiente, todas las empresas o instituciones cuyas actividades (como la extracción, producción o comercialización) generen aguas residuales son directamente responsables de tratarlas. Este tratamiento debe reducir la contaminación hasta cumplir con los límites máximos permisibles (LMP), los estándares de calidad ambiental (ECA) y otras normas.

El Decreto Supremo N° 010-2010-MINAM, que aprueba los Límites Máximos Permisibles (LMP) para efluentes líquidos, establece en su Anexo 1 el valor de 0.0016 mg/L como límite máximo permisible para el promedio anual de mercurio total en

descargas de actividades minero-metalúrgicas. Todas las operaciones de este sector realizadas en el país deben cumplir obligatoriamente con esta disposición.

El Decreto Supremo N° 011-2017-MINAM establece los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para suelo, fijando los límites máximos permisibles de metales pesados —como arsénico, cadmio, plomo y mercurio— según las diferentes categorías de suelo. Esta norma constituye el marco de referencia oficial para caracterizar el nivel de contaminación en suelos impactados por relaves mineros.

El Decreto Supremo N° 004-2017-MINAM aprueba los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para agua, los cuales definen las concentraciones máximas admisibles de componentes físicos, químicos y biológicos para proteger la salud de las personas y los ecosistemas. Dichos estándares constituyen el referente técnico-legal para evaluar parámetros críticos como los metales pesados, determinando la idoneidad del recurso hídrico para usos como el consumo humano y abrevadero de animales.

## **CAPÍTULO III**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Ámbito de estudio**

El estudio se realizó en el centro poblado de La Rinconada, ubicado en el departamento de Puno, Perú, a más de 5000 msnm. Esta zona es reconocida por su intensa actividad minera artesanal e informal, principalmente de extracción de oro. Las condiciones extremas de altitud y clima, sumadas a la ausencia de un manejo adecuado de residuos mineros, han generado una problemática ambiental y sanitaria que hace indispensable el análisis físico químico y microbiológico de aguas y sedimentos contaminados con metales pesados y otras sustancias tóxicas.

#### **3.2 Tipo, nivel y diseño de la investigación**

##### **3.2.1 Tipo de la investigación**

La presente investigación es de tipo aplicada, ya que busca generar conocimientos orientados a resolver problemas concretos vinculados a la contaminación ambiental y sus implicancias microbiológicas, particularmente en áreas de explotación minera como La Rinconada.

##### **3.2.2 Nivel de la investigación**

El nivel de investigación es descriptivo-explicativo. Es descriptivo porque se identifican y caracterizan las condiciones microbiológicas y fisicoquímicas de las muestras recolectadas (agua y sedimentos). A su vez, es explicativo porque se busca analizar las posibles relaciones entre la contaminación por actividad minera y la presencia de microorganismos adaptados o alterados en estos ambientes.

##### **3.2.3 Diseño de la investigación**

En cuanto al diseño, se adopta un enfoque no experimental y transversal. No experimental, porque no se manipulan deliberadamente las variables del estudio; se observa y analiza la realidad tal como ocurre.

### **3.3 Población y muestra**

#### **3.3.1 Población**

La población del estudio estuvo conformada por los cuerpos de agua y sedimentos presentes en las zonas de extracción minera ubicadas en el centro poblado de La Rinconada, Puno, Perú. Esta población incluye efluentes provenientes de molinos, pozas de relaves, trapiches y zonas de descarga minera, así como los sedimentos acumulados en dichos puntos. Estos ambientes constituyen ecosistemas alterados por la actividad minera artesanal e informal, con alta probabilidad de contaminación química y microbiológica.

En este caso, se consideran los cuerpos de agua y los sedimentos de zonas contaminadas por la minería como la unidad de análisis principal.

#### **3.3.2 Tamaño de muestra**

El principio fundamental del muestreo de aguas reside en la obtención de una alícuota representativa del cuerpo hídrico, de volumen manejable para su transporte y análisis en el laboratorio. Este principio postula que la muestra debe ser preservada y manipulada mediante protocolos estandarizados, con el fin de garantizar que su composición físico-química y microbiológica no experimente alteraciones significativas entre el momento de la recolección y el análisis posterior.

La muestra de estudio se consideró agua residual efluente y es de tipo probabilístico por representatividad, aplicando la técnica de muestreo simple o puntual. Para el análisis en laboratorio se requiere una mínima porción de muestra en mililitros; por tal razón se ha considerado 1 litro por cada muestra y 500 mg para el sedimento.

El muestreo de agua residual y sedimento se realizó sobre un total de cuatro muestras ambientales (tres líquidas y una sólida), recolectadas en el centro poblado La Rinconada, ubicado en el distrito de Ananea, provincia de San Antonio de Putina, departamento de Puno. El muestreo se realizó mediante el método simple o puntual, de conformidad con la R.J. N.º 010-2016-ANA, el cual consiste en la obtención de una muestra única en un punto específico y en un momento determinado para su posterior análisis.

Descripción de las muestras:

- M1: Efluente del molino de la mina.
- M2: Poza de relaves.
- M3: Descarga hacia la laguna Rinconada.

Asimismo, se recolectó una muestra de sedimento.

- S1: Sedimento de la poza de relaves.

### **3.4 Materiales e instrumentos**

#### **3.4.1 Equipo e instrumentación**

Los equipos utilizados en el desarrollo experimental permitieron realizar mediciones, incubaciones, observaciones y análisis precisos, fundamentales para garantizar la calidad de los resultados. Se emplearon los siguientes: Agitador magnético AGIMATIC-E con calefacción. J.P. SELECTA, Imán agitador PTFE de 3mm, Baño maría DAIHAN SCIENTIFIC WB-6, Incubadora MEMMERT Modelo SN-55, Balanza analítica OHAUS PIONEER Modelo PX224/E, Autoclave DAIHAN SCIENTIFIC Modelo Maxiteril 80P, Microscopio Leica ICC50 W, Estereoscopio Leica EZ4 E, Contador de colonias J-2 Colony Counter, Termómetro ambiental, Ph-metro portátil Oakton® pHTestr® 30+, Conductímetro portátil Oakton WD-35462-11.

#### **3.4.2 Material de laboratorio**

Probetas de 100 mL, probetas de 500 mL, matraces de 250 mL, matraces de 100 ml, pipeta de 5 ml, pipeta de 10 ml, propipeta, placas petri de 20 ml, portaobjetos, cubreobjetos, pipeta de pasteur, micropipeta de 100 µl, punta de micropipeta, tubos de ensayo de 10 ml, mechero bunsen, asa de khole, espátula.

#### **3.4.3 Insumos y reactivos**

Agua destilada, cristal violeta, lugol, alcohol-acetona, safranina, aceite de inmersión, bicloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>), ácido nítrico (H<sub>2</sub>NO<sub>3</sub>). Bicloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>), Ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>).

#### **3.4.4 Medios de cultivo**

Agar nutritivo, Agar sangre, Agar Infusión Cerebro-Corazón (BHI)

### 3.4.5 Software

Gen Bank, MEGA, BioEdit, Google Earth Pro.

## 3.5 Procedimiento metodológico

### 3.5.1 Caracterización fisicoquímica de los relaves mineros de La Rinconada

#### a. Área de estudio y lugar de muestreo

Las muestras se recolectaron en cuatro puntos estratégicos del centro poblado de La Rinconada, ubicado en el distrito de Ananea, provincia de San Antonio de Putina, departamento de Puno. Los puntos de muestreo fueron los siguientes: descarga de molinos (M1), poza de relaves (M2), descarga hacia la laguna (M3) y sedimento de la poza de relaves (S1).

#### Tabla 4.

*Actividades de extracción ubicada en el Centro poblado La Rinconada*

Punto de muestreo	Ubicación	Descripción de la actividad
M1	Molino zona de extracción	Se realiza la descarga de los molinos, que contienen el material extraído con el mercurio.
M2	Poza de relaves	Se realiza la acumulación del agua utilizada en la poza de relaves.
M3	Laguna Rinconada	Se realiza la descarga hacia la laguna.
S1	Molinos	Posterior al proceso de descarga de molinos se acumulan sedimentos propios del material extraído.

*Nota.* Detalles de los puntos considerados según la actividad extractiva que se realiza en el centro Poblado La Rinconada. Fuente: elaboración propia.

**Puntos de muestreo:** La determinación de la posición geográfica de los sitios de estudio se llevó a cabo mediante el software de cartografía digital Google Earth Pro (versión 7.3.6). Las coordenadas de longitud y latitud obtenidas fueron convertidas al sistema de coordenadas planas UTM WGS84, registrándose para cada punto el huso o zona (19S), la coordenada Este, la coordenada Norte y la elevación en metros sobre el nivel del mar (m s. n. m.). Este protocolo de registro espacial permite la exacta localización de los puntos para su posterior re-evaluación.

**Tabla 5**

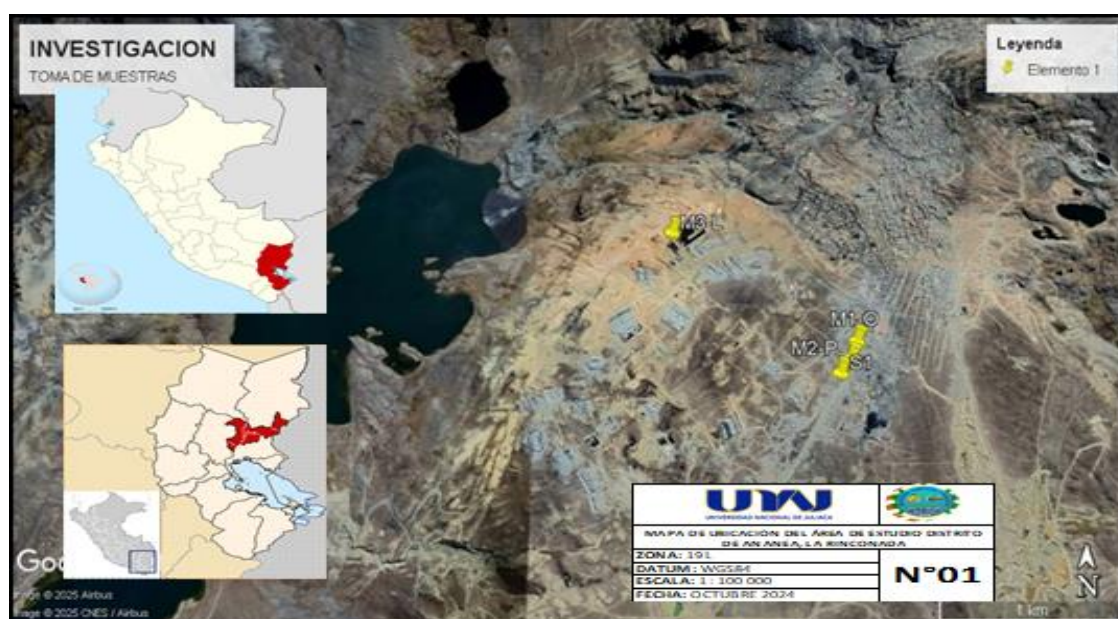
*Puntos de muestreo- Google Earth*

Punto	Muestra	Concesión minera	Mineral extraído	UTM		Altitud	Zona
				Este	Norte		
M1	Efluente			451807	8382353	5065.3	19L
M2	Efluente	La	Oro,	451806	8382259	5056	19L
M3	Efluente	Rinconada	Cobre	451805	8382354	5063.4	19L
S1	Sedimento			451808	8382351	5061.3	19L

*Nota.* Descripción de los puntos tomados como muestra tanto de efluente como sedimento.  
Fuente: elaboración propia.

**Figura 4**

*Mapa de puntos de toma de muestras*



*Nota:* Adaptado del software Google Earth 2025. Fuente: elaboración propia.

## b. Análisis y toma de muestra de agua superficial y sedimentos de los relaves mineros

El concepto básico del muestreo de agua consistió en recolectar una cantidad representativa del líquido, con un volumen apropiado para facilitar su transporte y manejo en el laboratorio. Este criterio asegura que la muestra debe ser tratada de forma que sus propiedades y composición permanezcan esencialmente inalteradas hasta el momento de su análisis (León, 2023). Para la recolección de muestras biológicas y muestras para el análisis de parámetros fisicoquímicos descrito según métodos estandarizados APHA, 2017.

### Figura 5

*Frascos para toma de muestras*



*Nota.* De acuerdo al protocolo se considera la toma de muestras en agua y sedimento, para el análisis de parámetros físico químico y microbiológico. Fuente: elaboración propia.

Las muestras de agua se recolectaron en frascos de vidrio estériles para el aislamiento y la caracterización molecular; para el análisis de metales pesados se utilizó frascos de plástico y se tomaron las muestras correspondientes y las de sedimento en bolsas ziplock según protocolo (DIGESA, 2011).

Posterior a la toma de la muestra, se procedió a la adición inmediata de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) como preservante, seguido de un proceso de homogenización y cierre hermético del envase para mantener la integridad de la muestra. Se adicionó ácido nítrico para preservación, siguiendo los métodos estandarizados APHA, 2017

Se transportaron al laboratorio almacenándolos a  $4^\circ\text{C}$  (Yan et al., 2020).

**c. Determinación de la concentración de metales pesados en agua superficial de relaves mineros**

Las muestras de agua recolectadas, fueron llevadas hacia el Laboratorio BHIOS de la ciudad de Arequipa.

**Mercurio en agua superficial de relaves mineros**

Según el protocolo de análisis y la técnica, para la determinación de mercurio.

Para el pretratamiento de las muestras líquidas, se midieron alícuotas de 150 mL en vasos de precipitado previamente acondicionados con solución nítrico-agua desionizada (1:1). A cada alícuota se adicionaron 3 mL de ácido nítrico concentrado y 7 mL de ácido sulfúrico concentrado. La mezcla se sometió a digestión en baño isotérmico a 90°C, evitando cuidadosamente la ebullición, hasta alcanzar una reducción de volumen al 20% del inicial. Una vez enfriadas a temperatura ambiente, las muestras se filtraron al vacío mediante membranas de 0.45 µm en matraces aforados para eliminar material particulado en suspensión. Finalmente, se añadió permanganato de potasio al 5% hasta la persistencia de coloración púrpura en el medio, indicativo de condiciones oxidantes, previo al enfriamiento final a temperatura ambiente. (Cancapa, 2015).

Finalmente, se agregó una solución de cloruro de hidroxilamina al 1.5 % hasta alcanzar la decoloración completa del medio, evidenciada por la obtención de un líquido transparente. Una vez alcanzado este punto, la muestra se aforó hasta el volumen final. El mercurio (Hg) se determinó mediante el método ICP-MS según EPA METHOD 6020B.

**d. Determinación de la concentración de metales pesados en sedimentos**

La muestra de sedimento fue tomada de las pozas de relaves mineros del centro poblado La Rinconada, se estableció 1 punto de muestreo.

La metodología usada para sedimentos (Clesceri, 1998), se detalla a continuación:

La muestra de sedimentos se tomó en un peso de 500 g a 1000 g, en bolsas de plástico estériles con cierre hermético.

En el punto de muestreo, utilizó las bolsas estériles del cooler y se procedió a recolectar una muestra de sedimento a una profundidad de 20-30 cm, correspondiente a la capa

superficial del lecho acuático. La toma se realizó mediante un dispositivo de muestreo vertical, seguido de un arrastre para capturar el material sedimentario. Los sedimentos recolectados se transfirieron inmediatamente a bolsas plásticas previamente identificadas, las cuales se sellaron herméticamente, se rotularon con tinta indeleble y se almacenaron nuevamente en el cooler para su transporte bajo cadena de custodia al laboratorio.

La muestra fue identificada con una etiqueta que contenía la siguiente información: un código único, la fecha y hora exacta de recolección, la ubicación geográfica completa (país, departamento, provincia, distrito), el nombre específico y una referencia detallada del punto de muestreo, y finalmente, el nombre del responsable de la recolección

La muestra de sedimento recolectado, fue llevada hacia el Laboratorio BHIOS de la ciudad de Arequipa.

### **Mercurio en sedimentos**

Las muestras fueron secadas a 90°C en estufa, posteriormente molidas con mortero y tamizadas a 60 µm, almacenándose en bolsas de polietileno herméticas. Para la digestión ácida, se homogeneizó el sedimento y se pesó 1 g en un matraz Erlenmeyer previamente lavado con solución de HNO<sub>3</sub>-H<sub>2</sub>O desionizada (1:1). Se adicionaron 3 mL de HCl concentrado y 9 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado (relación 1:3 HCl/HNO<sub>3</sub>) manteniendo el matraz en baño de hielo. La mezcla se calentó en baño isotérmico a 85°C durante 3 horas. Finalmente, las muestras enfriadas se filtraron mediante papel de 0,45 µm y se aforaron a 50 mL, siguiendo el protocolo de Clesceri (1998).

La muestra de agua minero metalúrgico fue analizada en el laboratorio BHIOS, en donde se determinó metales totales (Hg, Cd, etc.), aplicando el método ICP-MS según EPA METHOD 6020B.

#### **e. Determinación de parámetros físico químicos in situ**

En las muestras de agua residual minero metalúrgico recolectada en el centro poblado La Rinconada, se evaluaron los siguientes parámetros fisicoquímicos in situ, cuyos resultados se presentan en la siguiente tabla:

## Tabla 6

### Parámetros de campo

Determinación de Parámetros de campo de agua residual minero - metalúrgico
pH
C.E. (uS/cm)
Temperatura (°C)

*Nota:* D.S. No 015 – 2015 – MINAM. “Parámetros mínimos de campo”. Tomado de León, (2023).

En la Tabla 6. Muestra los parámetros de campo físico-químicos que se determinaron en el sitio de una muestra de agua residual de acuerdo con las regulaciones de aguas residuales del Departamento de Medio Ambiente. Se midieron in situ pH, temperatura y conductividad eléctrica usando potenciómetro portátil.

**Temperatura:** La lectura de la temperatura se realizó en el mismo lugar de muestreo, sumergiendo un termómetro digital en el interior de la muestra tomada, en cada punto de muestreo y esperando hasta que se logre una lectura constante, esta evaluación se realizó in situ y se tomó nota de las temperaturas registradas respectivamente (Cancapa, 2015).

**Conductividad eléctrica:** Se utilizó un pequeño matraz de vidrio de 100 ml limpio y seco, al cual se agregó 50 ml de muestra de agua en estudio, con el conductímetro digital Oakton®, hasta que el equipo estabilice la lectura. Una vez que se realizó la lectura, se anotó los valores obtenidos en cada punto muestreado con cifras significativas (Cancapa, 2015).

**Potencial de hidrogeniones:** Para determinar el pH de manera rápida y precisa, se recolectaron muestras de agua en cada punto de muestreo y se midieron in situ con un pHmetro Oakton®. Los valores obtenidos se registraron respetando el número de cifras significativas que garantiza la precisión del instrumento. (Cancapa, 2015).

### **3.6 Caracterización microscópica y macroscópica de microorganismos aislados de los relaves mineros**

#### **a. Preparación de medios de cultivo**

Se prepararon los siguientes medios estériles para aislamiento y crecimiento: Primero se utilizó Agar Nutritivo como medio de cultivo de enriquecimiento; posterior a ello se utilizó Agar Infusión Cerebro-Corazón (BHI) para el proceso de aislamiento y adición de Bicloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ) como medio de tolerancia para los microorganismos (Gongora Flores, 2021). Finalmente se utilizó Agar Sangre como medio selectivo para conocer bacterias con potencial hemolítico.

Se realizó la preparación de cada medio de cultivo según las indicaciones del fabricante, considerando cantidades para 3 repeticiones por cada muestra.

#### **b. Aislamiento de microorganismos**

Método de aislamiento por vertido en placa: también llamado método de dilución o vaciado en placa proporciona por lo general placas con un número apropiado de colonias y se basa en una dilución aproximadamente cuantitativa de la muestra original en un medio sólido (Bailón et al., 2003).

Las diluciones seriadas de las muestras se sembraron con asa de Kolle en placas Petri con agar BHI suplementado con  $\text{HgCl}_2$  para seleccionar cepas resistentes, se incubaron a 35 °C durante 24 horas, y posteriormente se seleccionaron colonias diferenciadas macroscópicamente según su forma, tamaño, color y textura.

Para aislar la comunidad bacteriana a partir de las muestras de agua provenientes de los relaves mineros, se aplicó la metodología propuesta por Camacho et al. (2009), la cual fue de la siguiente manera:

Primero, se distribuyeron las placas de Petri en la mesa de trabajo, marcando cada base con los datos correspondientes para facilitar su identificación. A continuación, se inoculó por triplicado 1 mL de la dilución correspondiente en cada placa utilizando una pipeta estéril.

Inmediatamente después, se agregaron de 15 a 20 mL de medio de cultivo Agar Nutritivo fundido, previamente ajustado a pH 8 con hidróxido de sodio (verificado con tiras

reactivas de pH). Para homogenizar la mezcla, se realizaron movimientos suaves y alternados en forma circular (en sentido horario y antihorario) y laterales (de atrás hacia adelante) sobre una superficie plana, hasta lograr la completa incorporación del inóculo en el medio, evitando que este contactara con las tapas de las placas.

Posteriormente, se dejó solidificar el medio. Cabe destacar que el tiempo transcurrido entre la incorporación de la muestra al diluyente y la adición del medio de cultivo no excedió los 20 minutos en ningún caso. Finalmente, las placas se incubaron en posición invertida durante 3 días a  $37 \pm 1$  °C.

El aislamiento a cultivo puro o axénico y la identificación bacteriana se realizó de la siguiente manera:

**Método de aislamiento de cultivo puro por técnica de estría cruzada en placa:** los cultivos puros están formados por un solo tipo de microorganismo; y son indispensables para conocer las características morfológicas, propiedades de tinción, actividad bioquímica, patogenicidad, sensibilidad a antibióticos e identificación de las especies microbianas (Aquiahuatl y Pérez, 2004). Para hacer el aislamiento a cultivo puro o axénico, se realizó de manera similar a la metodología propuesta por Moraga et al. (2003), donde se seleccionó las colonias al azar y se cultivó mediante la técnica de estría cruzada en placas contenidas de agar Cerebro -Corazón. Después de ser incubados por 4 días a temperatura de 25°C, las colonias se identificaron mediante las siguientes pruebas bioquímicas: Catalasa, Oxidasa, TSI, LIA, Citrato de Simmons. La técnica de cultivo que se utilizó fue la de estría cruzada en placa, donde se aplicó la metodología según Aquiahuatl y Pérez (2004), la cual fue de la siguiente manera:

Primero, en la parte posterior y exterior de la placa con agar Cerebro - Corazón, se dividió en cuatro cuadrantes. Se tomó una colonia bacteriana utilizando un asa de Kolle de punta circular previamente flameada y enfriada. Durante la inoculación, se realizaron de 4 a 5 estrías simples y muy próximas entre sí en el primer cuadrante de la placa, la cual se cerró inmediatamente para evitar contaminaciones. Luego, el asa de inoculación fue flameada nuevamente y la placa Petri se giró un cuarto de vuelta. Al abrirla otra vez, se enfrió el asa tocando una zona del medio alejada de las estrías recientes, tras lo cual se pasó suavemente por el área original de estrías y se efectuó un segundo grupo de estrías en el segundo cuadrante, siguiendo el mismo procedimiento anterior.

Se seleccionó una colonia bacteriana con un asa de Kolle de punta circular previamente esterilizada por flameado y enfriada. Esta se inocula realizando 4-5 estrías simples y contiguas a lo ancho del primer cuadrante de la placa, manteniéndola cerrada para prevenir contaminación. Posteriormente, se reesterilizó el asa por flameado y se rotó la placa Petri 90°. Al abrirla nuevamente, se enfrió el asa tocando el medio de cultivo en una zona alejada de las estrías previas. Finalmente, se rozó ligeramente el asa sobre el área de estrías original y se procedió a realizar un nuevo conjunto de estrías en el segundo cuadrante, replicando el patrón anterior.

Finalmente, se repitió el procedimiento en el tercer cuadrante y al efectuar la siembra en el último cuadrante, no se flameó el asa de siembra solo se hizo una estría más abierta (Figura 6).

### **Figura 6**

*Microorganismos con potencial de crecimiento en la sal metálica (HgCl<sub>2</sub>).*



*Nota.* Se considera la evaluación del potencial inhibitorio en sal metálica (HgCl<sub>2</sub>), sobre el crecimiento microbiano en muestras de relave minero (agua y sedimento). Fuente: elaboración propia.

### **3.7 Caracterización macroscópica**

Las bacterias aisladas se describieron morfológicamente considerando 9 características: forma, borde, elevación, superficie, textura o consistencia, propiedades ópticas, tamaño, configuración y color, según la metodología de Villota-Calvachi & Otero-Ramírez (2009).

El desarrolló la descripción correspondiente utilizando el Estereoscopio, en aumentos de 12x y 20x.

## a. Caracterización microscópica

Se realizó mediante tinción GRAM y pruebas bioquímicas, describiendo la forma presentada por cada uno, para ello se utilizó el microscopio Leica de la Universidad Nacional de Juliaca- Ayabacas; en los objetos de 40x y 100x añadiéndose aceite de inmersión en este último.

**Metodo de Tinción GRAM** (cristal violeta, lugol, alcohol-acetona, safranina): La técnica se llevó a cabo mediante un protocolo de tinción diferencial en cuatro etapas secuenciales: Primero se realizó la tinción primaria: para ello se aplicó el cristal violeta (colorante catiónico), luego se adicionó el lugol (yodo-yoduro potásico) para fijar el colorante y formar complejos insolubles. Seguidamente se usó alcohol/acetona para eliminar el complejo en bacterias Gram negativas, mientras las Gram positivas lo retienen y finalmente se aplicó safranina para las bacterias Gram negativas (Olivas, 2012).

**Prueba de catalasa:** La enzima catalasa, presente en microorganismos aeróbicos y anaerobios facultativos (exceptuando los *Streptococcus*) pero ausente en anaerobios estrictos, cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular. Este compuesto se genera como subproducto del metabolismo oxidativo de carbohidratos y, de acumularse, resulta tóxico para la célula bacteriana. La prueba de catalasa en portaobjetos permitió distinguir entre géneros como *Staphylococcus* (catalasa positiva) y *Streptococcus* (catalasa negativa), constituyendo una herramienta clave en la identificación microbiana (Sanabria y Mercedes, 2001).

**Prueba de oxidasa:** Se utilizó el medio de cultivo para diferenciar microorganismos, basado principalmente en el proceso de descarboxilación de ornitina, la movilidad e indol. Se preparó el medio de cultivo según indicaciones especificadas por el fabricante.

La prueba de oxidasa se desarrolló añadiendo 3 gotas de reactivo de Kovacs, pasado las 24 a 48h del proceso de incubación de las cepas.

### **Cultivos selectivos y diferenciales**

**Pruebas bioquímicas:** El perfil metabólico de los microorganismos puede identificarse al inocularlos en medios de cultivo que contienen sustratos específicos, los cuales sirven como fuentes de energía, carbono, donadores de electrones y otros nutrientes esenciales. Para ello, se emplean diversas pruebas bioquímicas que utilizan medios con indicadores

de pH, inhibidores selectivos (como bilis o cianuro) o sustancias reveladoras (colorantes, sulfuros), permitiendo detectar actividades como: fermentación de carbohidratos (glucosa, lactosa, sacarosa), catabolismo de aminoácidos y urea, y producción de enzimas hidrolíticas (oxidadas, reductasas, amilasas, lipasas, entre otras) (Aquiahuatl et al., 2012).

En este estudio se utilizaron medios diferenciales específicos: Agar Triple Azúcar y Hierro (TSI), Agar Lisina y Hierro (LIA), Agar Citrato de Simmons. Cada medio se preparó en tubos de ensayo con tapa rosca siguiendo las especificaciones del fabricante, considerando que cada uno requiere condiciones particulares de siembra, incubación e interpretación de resultados.

**LIA:** Se utilizó el medio de cultivo para diferenciar microorganismos, basado principalmente en el proceso de descarboxilación y diseminación de la lisina y producción de ácido sulfhídrico. Se preparó el medio de cultivo según indicaciones especificadas por el fabricante.

**TSI:** Se utilizó el medio de cultivo para diferenciación de entero bacterias, en base a la formación de azúcares como la glucosa, lactosa y sacarosa y producción de ácido sulfhídrico. Se preparó el medio de cultivo según indicaciones especificadas por el fabricante.

**Citrato –Simmons:** Se utilizó el medio de cultivo para diferenciación de microorganismos con capacidad de utilizar el citrato como su única fuente de carbono. Se preparó el medio de cultivo según indicaciones especificadas por el fabricante.

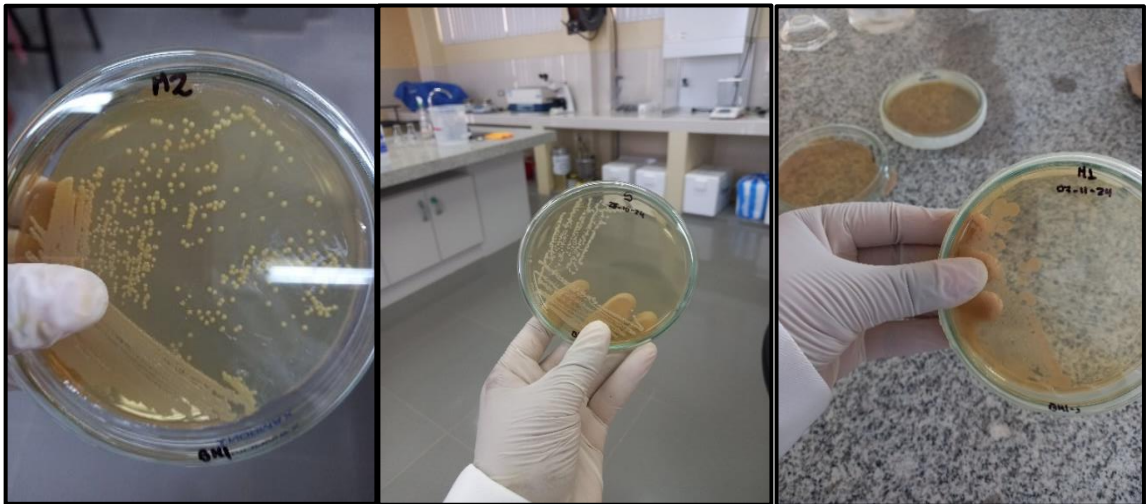
## **b. Purificación de cepas**

Para establecer las concentraciones máximas tolerables (CMT) de metales pesados (Hg), se utilizó aplico la metodología de (Houdt et al., 2012), donde se evaluó el crecimiento del aislado bacteriano en agar BHI con concentraciones progresivas de estos iones (de 10 y 50 mg L<sup>-1</sup>). Previamente, se prepararon y esterilizaron soluciones stock de sal metálica en agua bidestilada. Como control, se emplearon placas de agar BHI sin adición de metales. Todos los ensayos se realizaron con tres réplicas (Rajkumar et al., 2013). Las bacterias se incubaron a 35 °C durante 7 días, y la CMT se definió como la máxima concentración de metal que permitió el crecimiento visible de las colonias.

Cepas con mayor resistencia y características representativas se purificaron por subcultivo en placas nuevas hasta obtener cultivos puros. Durante el proceso se identificaron cepas bacterianas que presentaron un nivel de resistencia mayor a comparación de las demás, tomándose así como cepas representativas y se procedió a la toma de cada cepa en una placa Petri con medio de cultivo nueva para proceder con la purificación de las mismas. Se seleccionaron al azar al menos tres colonias individuales de cada placa y se purificaron cuatro veces para obtener cultivos puros siguiendo los procedimientos indicados mostrados en la Figura 7.

### Figura 7

*Cepas aisladas y purificadas*



*Nota.* Durante el proceso de purificación se obtuvieron las cepas M1, M2 y S1. Fuente: elaboración propia.

### 3.8 Amplificación y secuenciación de los microorganismos aislados

La metodología experimental fue desarrollada en condiciones controladas de laboratorio Laboratorio de ADN Uchumayo, siguiendo protocolos estandarizados para garantizar la reproducibilidad de los resultados. El proceso inició con la extracción de ADN utilizando kits de purificación comerciales. Posteriormente, el ADN purificado fue amplificado mediante la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), seguida de secuenciación mediante el método de Sanger. Se realizó el análisis bioinformático filogenético, con el método Fast Minimum Evolution y el modelo de distancias Jukes-Cantor, usando la secuencia de las especies más homologas que aparecen en análisis por

BLAST para la identificación de secuencias, mientras que la visualización y edición de electroferogramas se realizó utilizando el programa BioEdit (Gongora Flores, 2021).

### 3.9 Extracción de ADN

La identificación consistió en la extracción de ADN de la muestra utilizando MasterPure™ DNA Purification Kit, que incluye todos los reactivos necesarios para la purificación del material genético. Posteriormente, el ADN extraído se empleó para la amplificación mediante PCR de la región del gen 16S RNAr, correspondiente a un fragmento del ARN ribosomal de la subunidad 30S en procariotas (Biosearch Technologies, 2024).

Primero, se llevó a cabo la lisis celular utilizando un detergente aniónico que disuelve los componentes de la célula y bloquea la actividad de las nucleasas internas. Luego, las proteínas se desnaturalizan y eliminan mediante precipitación con sales. El ADN resultante en solución se precipita con isopropanol, se enjuaga con etanol y finalmente se disuelve en un tampón que mantiene su estabilidad. A continuación se describen las actividades del proceso según protocolo establecido del kit de purificación utilizado (Orfao & Morent, 2011; Reynoso et al., 2022).

- Se añadió la solución de lisis a cada muestra. Para asegurar una lisis celular eficiente, se verificó visualmente la homogeneidad de la mezcla. En los casos en que la muestra se observó homogénea, se procedió directamente con el siguiente paso del protocolo. Por el contrario, cuando se detectó la presencia de cuerpos celulares intactos, las muestras se incubaron a 37 °C hasta alcanzar una homogeneización completa. Dado que las muestras son estables en solución de lisis durante al menos dos años a temperatura ambiente, el protocolo pudo ser pausado en este punto. Para su conservación, las muestras se almacenaron en un lugar oscuro, lo que permitió reanudar el proceso en días posteriores sin afectar su integridad.
- Para obtener una muestra libre de ARN, se añadió ARNasa a cada una de las muestras, seguido de una incubación a 37 °C durante un período de 30 minutos. Se aplicó de manera sistemática en los distintos tipos de muestra. La cantidad de ARNasa añadida fue proporcional al tipo y volumen de la muestra de partida, siguiendo estrictamente las recomendaciones del protocolo específico correspondiente a cada tipo de muestra.

- Se añadió una solución salina para precipitar las proteínas citoplasmáticas y nucleares presentes en la muestra. Inmediatamente después, cada tubo se agitó vigorosamente con vórtex durante 30 segundos. A continuación, las muestras se centrifugaron a la velocidad y durante el tiempo necesario para garantizar la precipitación completa de las proteínas. Tras la centrifugación, las proteínas precipitadas formaron un botón de color marrón en el fondo de cada tubo. Se verificó que el sobrenadante estuviera sin turbidez ni partículas visibles o trazas de color marrón.
- El sobrenadante, que contenía el ADN en solución, fue transferido cuantitativamente a un nuevo tubo que contenía isopropanol. Posteriormente, la muestra se mezcló con el isopropanol mediante la inversión suave del tubo aproximadamente 50 veces. Durante este paso, se observó la formación de un precipitado filamentosamente blanquecino, correspondiente a la hebra de ADN. Cabe señalar que la visualización de este precipitado dependió críticamente de la concentración y cantidad inicial de ADN en la muestra.
- Las muestras se centrifugaron para precipitar el ADN en el fondo del tubo. Tras la centrifugación, se observó el ADN como un precipitado de aspecto blanquecino en el fondo de cada tubo.
- Se eliminó con sumo cuidado el sobrenadante mediante decantación. A continuación, el tubo que contenía el precipitado de ADN se colocó invertido sobre una hoja limpia de papel absorbente durante aproximadamente 5 minutos para eliminar al máximo los restos de isopropanol.
- Se añadió etanol al 70% al tubo, se tapó y se invirtió suavemente varias veces con el fin de lavar el precipitado de ADN de manera homogénea.
- La muestra se centrifugó a la velocidad y tiempo adecuados para sedimentar nuevamente el ADN. Posteriormente, el etanol se eliminó mediante decantación o extracción cuidadosa con punta de pipeta, evitando tocar el precipitado para prevenir su desprendimiento. Se verificó visualmente que el precipitado de ADN permaneciera adherido al fondo o a las paredes del tubo.
- El exceso de etanol se eliminó colocando el tubo invertido sobre papel absorbente durante 2-3 minutos. Alternativamente, en algunos casos se dejó secar al aire durante 5-10 minutos, hasta que no se observaron restos de líquido. Se evitó un secado excesivo del precipitado para facilitar su posterior resuspensión.

- Se procedió a hidratar el ADN con 100  $\mu$ L de solución tamponada adecuada: tampón TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM) o agua estéril libre de nucleasas.
- Para favorecer la resuspensión completa del ADN, las muestras se incubaron a 65 °C durante 1 hora. Después de la incubación, se mantuvieron en agitación suave a temperatura ambiente durante 2 horas. Periódicamente, se comprobó con punta de pipeta que el ADN estuviera completamente resuspendido, sin grumos ni material viscoso visible.

### 3.10 Amplificación por PCR

La PCR es una técnica rápida, sensible y bastante simple para amplificar el DNA, utilizando oligonucleótidos como cebadores, desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs) y una DNA Taq polimerasa termoestable (Rodríguez Rodríguez et al., 2021). Las especies bacterianas se identificaron por PCR utilizando cebadores universales de RNAr 16S (Sangon Biotech Shanghai Co., Ltd.): 27F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y 1492R (TACGGCTACCTTGTTACGACTT) (Arruda et al., 2021). El programa de PCR implicó un ciclo inicial a 95 °C durante 30 seg, seguido de 30 ciclos a 50 °C durante 30 seg. , con una extensión final a 72 °C durante 45 seg. Los productos de PCR fueron purificados usando el kit Qiagen PCR purification, y se siguió las instrucciones de la compañía.

Para la preparación de la muestra, en un tubo para PCR se agregaron los siguientes reactivos: ADN molde, iniciadores (primers), desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), solución amortiguadora (buffer), cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ), agua libre de nucleasas y ADN polimerasa termoestable (Tabla 7). Opcionalmente, se puede incorporar compuestos estabilizadores para la polimerasa (Eren et al., 2023).

- Los componentes se mezclaron mediante vortex durante 2-3 segundos o mediante inversión suave del tubo, siguiendo el protocolo de Stirling (2004).
- La mezcla se centrifugó brevemente para reunir todo el contenido en el fondo del tubo.

**Tabla 7***Reactivos, volúmenes y concentraciones finales usadas para la PCR*

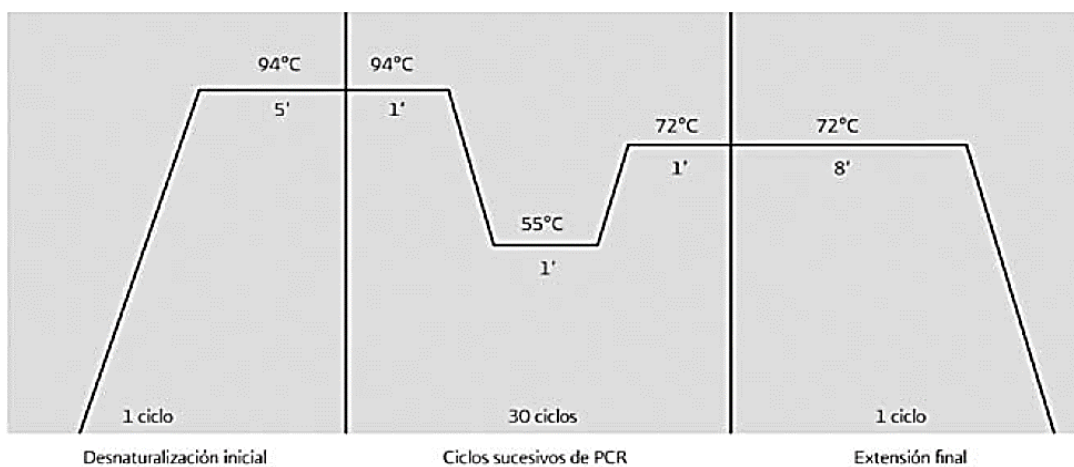
Reactivo	Volumen (50 $\mu$ L)	Concentración final
ddH <sub>2</sub> O	41.25 $\mu$ L	n/a
BUFFER [10X]	5 $\mu$ L	1X
MgCl <sub>2</sub> [50 mM]	1.5 $\mu$ L	1.5 mM
dNTPs [ 10 mM]	0.5 $\mu$ L	100 $\mu$ M
Iniciadores [20 $\mu$ M]	0.25 $\mu$ L	0.1 $\mu$ M
ADN	1 $\mu$ L	10 ng
ADN Polimerasa [5 U/ $\mu$ L]	1 $\mu$ L	1-2.5 unidades

*Nota.* Tomada de Ramírez Salcedo et al., (2014)

Para la amplificación, las muestras se colocaron en el termociclador, programado con las condiciones de amplificación preestablecidas (Figura 8). El proceso constó de las siguientes etapas:

**Desnaturalización inicial.** Se ejecutó un ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 2 minutos para asegurar la separación completa de las hebras de ADN y la activación de la polimerasa termoestable.

**Ciclos de amplificación.** Se realizaron 35 ciclos sucesivos que incluyeron las siguientes etapas:

**Figura 8***Etapas de la PCR. Temperaturas, tiempos y ciclos estándares.**Nota.* Tomado de Ramírez Salcedo et al., (2014)

**Desnaturalización.** En esta etapa el ADN molde se desnaturalizó completamente. Para lograrlo de manera adecuada se utilizó a una temperatura de 95°C durante 30 segundos a 1 ciclo. Para moldes con alto contenido de GC, se extendió el tiempo a 45 segundos.

**Alineamiento.** Al disminuir la temperatura de incubación los iniciadores se unen al ADN molde en las zonas 3' complementarias. Ambos iniciadores se unen de manera específica al ADN flanqueando el fragmento que se quiere amplificar. En este caso, la temperatura y el tiempo van a depender de 3 factores relacionados con los iniciadores: la concentración, el número de bases y el porcentaje de guaninas-citosinas. La temperatura se redujo a 50 °C durante 45 segundos, permitiendo la hibridación específica de los iniciadores con las regiones complementarias del ADN molde. Un aumento de temperatura o del tiempo favorece la especificidad porque disminuye las uniones incorrectas de los iniciadores con la hebra molde (Reynoso et al., 2022).

**Extensión.** Esta etapa, también conocida como elongación, amplificación o polimerización, consiste en la síntesis de la nueva cadena de ADN, a partir del extremo 3' del iniciador por acción de la ADN polimerasa, empleando como sustrato los cuatro dNTPs. La síntesis de nuevas hebras se llevó a cabo a 72 °C durante 1 minuto, aprovechando la actividad óptima de la Taq polimerasa a esta temperatura.

**Extensión final.** Tras completar los ciclos, se realizó una extensión final a 72 °C durante 7 minutos para garantizar la síntesis completa de todos los fragmentos amplificados.

### 3.11 Verificación y secuenciación

Los productos purificados de PCR, fueron secuenciados usando la técnica de Sanger que utiliza colorantes Big Dye V3.1 y leídos en un equipo ABI 3730xl (Analizador de ADN ABI 3730xl, Applied Biosystems, EE. UU.).

Se detectó la secuencia del gen RNAr16S para bacteria, las secuencias revisadas se compararon con la base de datos de NCBI usando el software BLAST - blastn suite.

El procedimiento se realizó mediante el secuenciador automatizado.

Primero la reacción de secuenciación se realizó en un único tubo, utilizando ddNTPs (didesoxinucleótidos) marcados individualmente con fluoróforos específicos, cada uno con una longitud de onda de emisión distintiva. La reacción empleó una ADN polimerasa

termoestable, permitiendo la amplificación cíclica de los fragmentos de ADN de manera exponencial.

La separación de los fragmentos generados se llevó a cabo mediante electroforesis capilar. Durante este proceso, los fragmentos de ADN, que difieren en longitud, migraron a través del capilar y fueron detectados de manera secuencial al llegar al extremo final. En este punto, un láser excitó el fluoróforo unido al ddNTP incorporado en el extremo de cada fragmento, y un detector captó la señal de fluorescencia emitida (Ramírez-Salcedo et al., 2014).

La señal óptica se tradujo en datos de secuencia, donde cada nucleótido se representó mediante un pico de color específico en el cromatograma resultante. La posición relativa de cada pico indicó la posición del nucleótido en la secuencia de ADN.

### **3.12 Análisis bioinformático**

Las secuencias de RNAr 16S (subunidad 30S ribosomal) y análisis bioinformático con el software BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool en NCBI, y las coincidencias mostraron una cobertura superior al 99 % y se documentó la identidad (Arruda et al. 2021 citado por Xu et al. 2024 ). Se identificaron los microorganismos procarióticos presentes en la muestra. Este enfoque se basa en la comparación de las secuencias obtenidas contra bases de datos de referencia, permitiendo la asignación taxonómica con alta precisión gracias a las regiones hipervariables conservadas en este marcador filogenético universal.

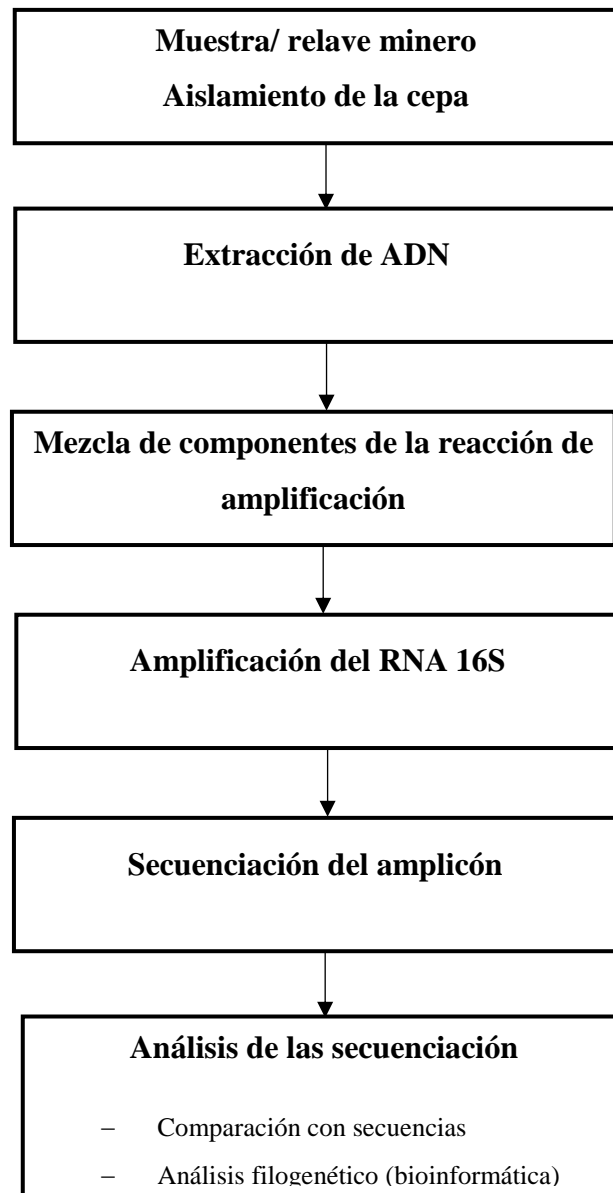
El archivo "seq.txt" contiene las secuencias FASTA procesadas, donde las bases con puntuación Phred  $\geq 20$  (alta calidad) se representan en mayúsculas y aquellas con menor calidad en minúsculas, siendo estas secuencias filtradas las utilizadas para el análisis comparativo de identificación; adicionalmente los electroferogramas se almacenan en archivos ABI que pueden visualizarse con software como BioEdit.

De acuerdo al análisis bioinformático inicial, el electroferograma fue la representación gráfica generada por el secuenciador automático como resultado de un proceso de electroforesis capilar. Este perfil gráfico mostró la secuencia de nucleótidos mediante la detección de señales de fluorescencia, donde cada base nitrogenada (A, T, C, G) representó con un color específico. La visualización y análisis básico de los electroferogramas se realizaron utilizando software de acceso abierto, como BioEdit.

Se realizó la revisión exhaustiva de los electroferogramas antes del análisis posterior, mediante ello se evaluó la calidad de la secuenciación; y los parámetros como la intensidad y resolución de los picos, el ruido de fondo y la ausencia de solapamientos entre señales que proporcionan información fundamental sobre la eficiencia de la amplificación por PCR y la confiabilidad de la secuencia generada.

**Figura 9**

*Diagrama de proceso de secuenciación*



*Nota.* Se describe en flujograma el proceso metodológico. Fuente: elaboración propia.

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Caracterización fisicoquímica de los relaves mineros de La Rinconada

##### 4.1.1 Parámetros físico-químicos in situ

**Tabla 8**

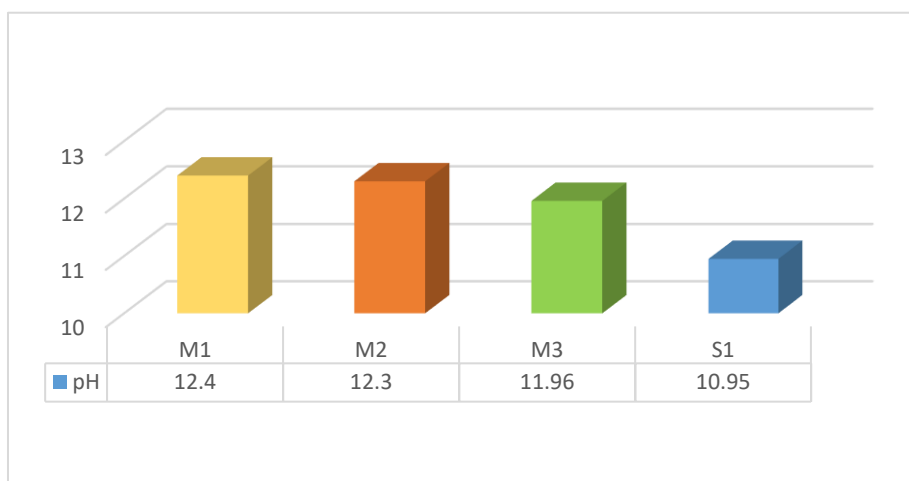
*Valores de pH, temperatura y conductividad*

Punto de muestreo	pH	Temperatura (°C)	Conductividad (μS/cm)
M1	12.40	14.4	1410
M2	12.30	15.1	1390
M3	11.96	14.2	1370
S1	10.95	6.1	1350

*Nota.* Valores registrados de la medición en los distintos puntos mediante el uso de multiparametro. Fuente: elaboración propia.

**Figura 10**

*Comparativa de valores de pH en muestras de agua y sedimentos.*



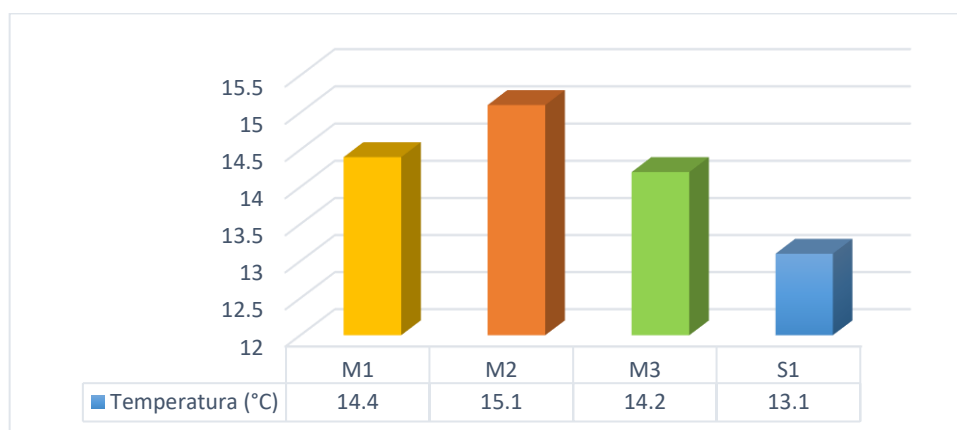
*Nota.* Resultados obtenidos de muestras tomadas de los relaves mineros del centro poblado La Rinconada. Fuente: elaboración propia.

En la Tabla 8 y Figura 10, se observan los resultados del pH con una notable variabilidad entre las muestras M1 que registra el valor más alto y S1 con el valor mínimo. Los valores

de pH registrados en este estudio muestran una marcada divergencia con los reportados en la literatura. Mientras que León (2023) documentó condiciones fuertemente alcalinas (pH 10.8) en aguas residuales mineras, y Mamani (2018) un pH cercano a la neutralidad (6.8) en relaves de La Rinconada, nuestros resultados contrastan aún más con los de Villamarín et al. (2014), quienes encontraron valores neutros a ligeramente alcalinos en sus muestreos. Esta discrepancia puede atribuirse a las diferencias metodológicas y contextuales clave del estudio de Villamarín et al. (2014), como el diseño muestral por cuencas, latitud y altitud, la evaluación en época seca para capturar la máxima concentración de contaminantes, y la inherente variabilidad mineralógica entre sitios. Dicha comparación refuerza la hipótesis de que las condiciones extremas observadas en nuestra área de estudio son consecuencia de una alteración antrópica (minera) significativa y localizada. La diferencia entre las muestras M1 y S1 podría deberse a factores como la proximidad a fuentes de vertimiento, la capacidad de amortiguación del suelo o la dilución por escorrentía. Los niveles de pH en este estudio son consistentemente alcalinos y salinos, característicos de vertimientos industriales sin tratamiento; lo que sugiere la presencia de sustancias básicas, evidenciando contaminación con químicos industriales como la lejía, utilizada en el proceso de extracción del mineral. Esta alcalinidad extrema es particularmente preocupante, ya que puede incrementar la movilidad y biodisponibilidad de metales pesados (como plomo y mercurio) y otros compuestos tóxicos, potenciando su impacto en los cuerpos de agua receptores y los ecosistemas asociados (Casares, 2012).

### Figura 11

*Comparativa de la temperatura entre muestras de agua y sedimentos*

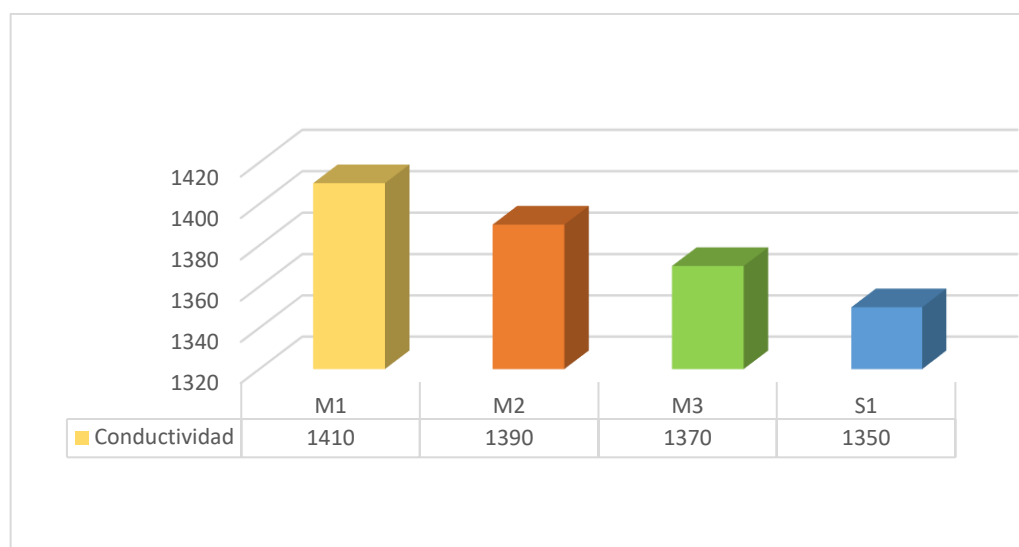


*Nota.* Resultados obtenidos de muestras tomadas de los relaves mineros del centro poblado La Rinconada. Fuente: elaboración propia.

Los datos presentados en la Tabla 8 y la Figura 11 muestran una variabilidad moderada en la temperatura del agua, cuyos valores oscilaron entre 13.1 °C (punto S1) y 15.1 °C (punto M2), con un promedio de 14.2 °C. Este promedio es concordante con los 14.2 °C reportado por León (2023) para la Laguna Cerro Lunar de Oro en la misma zona minera de Rinconada, y resulta muy similar al promedio de 14.52°C documentado por Villamarín et al. (2014) en ríos altoandinos de Perú y Ecuador. Esta coincidencia refuerza la interpretación de que, en estos ecosistemas de alta montaña, la temperatura responde principalmente a factores naturales, como el fuerte gradiente altitudinal característico de los Andes, el cual ha sido señalado como el principal determinante de la variabilidad fisicoquímica en ríos altoandinos (Jacobsen & Brodersen, 2008; Villamarín et al., 2014). Este mecanismo se fundamenta en la relación inversa bien establecida entre altitud y parámetros como la presión atmosférica, el oxígeno disuelto y la temperatura, lo que sugiere que las fluctuaciones térmicas observadas en nuestro estudio no serían un indicador primario de contaminación antrópica.

### Figura 12

*Conductividad eléctrica ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) en muestras de agua y sedimento.*



*Nota.* Resultados obtenidos de muestras tomadas de los relaves mineros del centro poblado La Rinconada. Fuente: elaboración propia.

En la Tabla 8 y Figura 12, los valores de conductividad eléctrica obtenidos oscilan entre 1350  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (S1) y 1410  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (M1), lo que indica una variabilidad moderada entre los puntos de muestreo, aunque sin diferencias significativas. Estos resultados son

consistentes con los reportados por León (2023), quien en su investigación reportó conductividades de hasta 1600  $\mu\text{S}/\text{cm}$  en aguas de características similares, lo que refuerza la idea de que la zona presenta una elevada concentración de iones disueltos. Cabe destacar que todos los valores registrados en este estudio superan el límite establecido en los LMP para aguas minero - metalúrgico. Este exceso coincide con lo observado por Loza del Carpio & Ccancapa Salcedo (2020), quienes reportaron conductividades de 1403.33  $\mu\text{S}/\text{cm}$  en su investigación, superando también en un 40% el valor de referencia. La alta conductividad sugiere la presencia significativa de iones disueltos, como sales, minerales y compuestos iónicos (Moore et al., 2008), lo que podría estar asociado a actividades antropogénicas, como vertimientos industriales, agrícolas o mineros. Además, este ambiente iónico favorece la movilidad y transporte de metales pesados, incrementando su potencial dispersión y biodisponibilidad en el sistema acuático.

#### 4.1.2 Concentración de metales pesados (Hg)

Los resultados muestran una variación significativa en las concentraciones de mercurio (Hg) entre los puntos analizados. Mientras que M1, M2 y M3 presentan niveles bajos (0.00229 – 0.00724 mg/L), compatibles con valores cercanos a los límites permisibles en aguas (según estándares internacionales como la OMS y EPA) mostrados en la Tabla 9; el punto S1 registra una concentración extremadamente alta (330.1372 mg/L), indicando una contaminación severa por mercurio (Tabla 10).

**Tabla 9**

*Comparación de concentraciones de metales pesados (Hg) por punto.*

Punto de muestreo	Código	Concentración de mercurio (mg/L)
M1	7051- 2024	0.00229
M2	7052- 2024	0.00724
M3	7053- 2024	0.00446

*Nota.* Nivel más alto de concentración de metal pesado (Hg), considerando el proceso de inhibición en los microorganismos. Fuente: elaboración propia.

En la Tabla 9, se evidencia una diferencia significativa en los niveles de mercurio encontrados en cada muestra analizada, considerándose una contaminación heterogénea

por mercurio (Hg) en los puntos analizados. Los resultados de este estudio, en concordancia con lo reportado por Loza del Carpio & Ccancapa Salcedo (2020), indican la presencia generalizada de mercurio en el sistema acuático evaluado. Las concentraciones de mercurio en agua, que variaron entre  $< 0.00005$  mg/L y  $0.00043$  mg/L, mostraron una distribución homogénea a lo largo del arroyo, lo que sugiere una dispersión efectiva del contaminante en la columna de agua.

**Tabla 10**

*Concentración de metales pesados (Hg) en muestra de sedimento.*

<b>Punto de muestreo</b>	<b>Código</b>	<b>Concentración de mercurio (mg/Kg)</b>
S1	7054- 2024	330.1372

*Nota.* Nivel más alto de concentración de metal pesado (Hg), considerando el proceso de inhibición en los microorganismos. Fuente: elaboración propia.

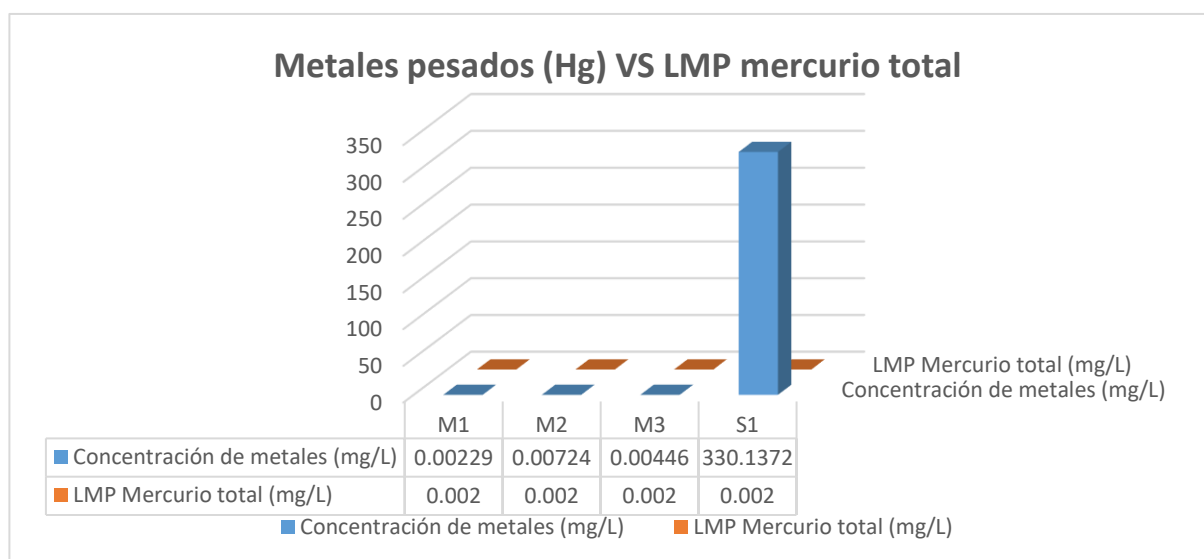
No obstante, la situación es considerablemente más crítica en los sedimentos (Tabla 10), donde se registrara un valor sustancialmente elevado, en el rango de 9 a 373 mg/kg comparados con los estándares canadienses de calidad ambiental (CEQG, por sus siglas en inglés). Está marcada diferencia en las concentraciones entre las dos matrices ambientales era previsible, ya que el mercurio posee una alta afinidad por las partículas sólidas, lo que conduce a su acumulación y persistencia en los sedimentos, los cuales actúan como un sumidero y una fuente potencial de contaminación secundaria a largo plazo.

La elevada contaminación por mercurio en la zona de estudio puede explicarse, en parte, por los cambios tecnológicos en las prácticas de extracción aurífera. Como señalan Goyzueta & Trigos (2009), la transición desde el uso de quimbaletes hacia molinetes, si bien incrementa la eficiencia y reduce el tiempo de procesamiento del mineral, conlleva paralelamente un mayor consumo de mercurio por ciclo de producción. Esta intensificación en el uso del metal, aunada a posibles liberaciones históricas, constituye una fuente antropogénica primaria que explica los niveles significativos encontrados tanto en agua como, especialmente, en los sedimentos del arroyo. La presencia de este metal en el ecosistema acuático representa un riesgo eco-toxicológico continuo, debido a su potencial bioacumulación y biomagnificación en las cadenas tróficas.

**Tabla 11***Concentración de metales pesados y límites máximos permisibles (LMP)*

Punto de muestreo	Concentración mercurio (mg/L)	LMP
		Mercurio total (mg/L)
M1	0.00229	0.002
M2	0.00724	0.002
M3	0.00446	0.002
S1	330.1372	0.002

*Nota:* Los datos de Límite Máximo Permissible para la comparativa corresponde al DS N° 010-2010-MINAM. Fuente: elaboración propia.

**Figura 13***Concentración de metales pesados (Hg) y LMP (mercurio total).*

*Nota.* Resultados de muestras de agua y sedimento provenientes de los relaves mineros del centro poblado La Rinconada. Fuente: elaboración propia.

En la Tabla 11 y Figura 13, se presenta una comparación entre la concentración de mercurio en cada muestra analizada en contraste con los Límites Máximos permisibles para efluentes minero metalúrgicos; en relación a ello se identifica un caso notable con la muestra S1, la cual presenta una concentración de 330.1372 mg/L de Hg, que supera 165,000 veces el LMP (0.002 mg/L), lo que sugiere una fuente puntual de contaminación.

La minería artesanal y de pequeña escala (MAPE) en la región Puno ha generado una contaminación significativa por metales pesados, afectando tanto los ecosistemas acuáticos como los suelos, con implicaciones graves para la salud humana y la biodiversidad. Los estudios analizados según (Novoa et al., 2022; Ayamamani, 2019; León, 2023; Fernández, 2019), coinciden en que las actividades mineras en zonas como Sandía, Carabaya, San Antonio de Putina y La Rinconada han liberado concentraciones alarmantes de mercurio (Hg), plomo (Pb), arsénico (As), hierro (Fe), manganeso (Mn) y otros metales, superando ampliamente los Límites Máximos Permisibles (LMP) y los Estándares de Calidad Ambiental (ECA) establecidos por normativas nacionales e internacionales. De igual manera Ayamamani (2019) demostró que los suelos de La Rinconada están contaminados por Hg, con valores de 0.200 a 0.750 mg/kg, acumulándose en sedimentos debido a su baja solubilidad.

Novoa et al. (2022) reportaron concentraciones de Hg en aguas cercanas a operaciones mineras que oscilan entre 0.0158 y 0.1301 mg/L, superando los límites permisibles para riego y consumo animal. En La Rinconada, los niveles de Hg variaron entre 0.0013 y 0.0188 mg/L, excediendo los valores de referencia de la OMS (0.001 mg/L). León (2023) encontró en la laguna Lunar de Oro concentraciones críticas de 21 metales, incluyendo Al (19.1 mg/L), Fe (11.6 mg/L), Mn (6.7095 mg/L), Pb (0.0822 mg/L), As (0.179 mg/L) y Hg (0.0087 mg/L), todos por encima de los LMP. Estos resultados contrastan con los de Fernández (2019) en el río Puyango-Tumbes, donde la ausencia de actividad minera mantuvo niveles mínimos de Hg (<0.0001 mg/L), Pb (0.029 mg/L) y As (0.012 mg/L).

La falta de canchas de relaves y sistemas de tratamiento agrava el problema, permitiendo que los metales se dispersen por escorrentía hacia ríos y lagunas. Directamente relacionada con vertidos directos de relaves mineros o procesos de amalgamación de oro hacia la laguna la Rinconada y posterior afectación a las fuentes de agua que conectan hacia los principales ríos, ya que la actividad se encuentra en una cabecera de cuenca. Se considera una contaminación inaceptable en la muestra S1; mientras que los otros puntos reflejan una exposición moderada pero aún relevante para la vigilancia ambiental. La disparidad entre sitios resalta la necesidad de estrategias diferenciadas de gestión del riesgo.

## **4.2 Caracterización microscópica y macroscópica los microorganismos aislados**

### **4.2.1 Aislamiento de microorganismos nativos**

Una vez aisladas las cepas presentes bajo condiciones se muestran en los medios de cultivos selectivo suplementado con sal metálica como se observa en la Figura 28. Villota-Calvachi et al. (2022) utilizaron medios suplementados para aislar bacterias productoras de biopolímeros (EPS y PHA) a partir de efluentes industriales. Este enfoque permitió seleccionar microorganismos adaptados a condiciones nutricionales variables, demostrando que el enriquecimiento en medios específicos es clave para identificar cepas con capacidades metabólicas deseadas. De manera similar, Maraza (2022) empleó medios alcalinos suplementados con cianuro para aislar bacterias degradadoras, simulando las condiciones extremas del pasivo minero. Estos casos resaltan la necesidad de ajustar los medios de cultivo al contaminante objetivo y a las condiciones fisicoquímicas del ambiente de origen (pH, salinidad, metales).

Góngora Flores (2021) y Yao et al. (2023) aislaron cepas resistentes a mercurio mediante enriquecimiento en medios con  $Hg^{2+}$ , seguido de técnicas de dilución seriada y siembra en agar selectivo. Este proceso es crítico para discriminar cepas con tolerancia real frente a aquellas que solo sobreviven por efectos de comunidad. La tinción de Gram y secuenciación del gen 16S rRNA fueron esenciales para confirmar la identidad taxonómica.

Rodríguez Rendón y Paredes Aranzamendi (2019) y Sibanda et al. (2019) utilizaron metodologías que preservan la diversidad natural como la secuenciación masiva del 16S rRNA para caracterizar comunidades complejas en relaves, sin depender de cultivos puros. El aislamiento de microorganismos de ambientes contaminados requiere un diseño experimental multietapa, desde el enriquecimiento selectivo hasta la caracterización molecular. La combinación de métodos clásicos (cultivo) con herramientas genómicas modernas maximiza el descubrimiento de cepas con aplicaciones en biorremediación, bioenergía y bioproducción.

### **4.2.2 Caracterización macroscópica y microscópica.**

Tras su purificación, las cepas se caracterizaron morfológicamente. Las colonias aisladas exhibieron características macroscópicas distintivas, las cuales se detallan en la Figura 14.

**Figura 14**

*Cultivos puros: Bacillus (a), Klebsiella (b), Staphylococcus (c)*

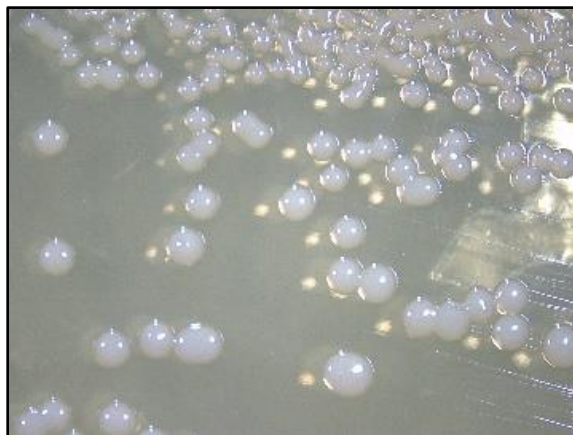
**a.**



**b.**



**c.**



*Nota.* A partir del proceso de aislamiento y purificación se obtuvo cultivos puros que se muestran.

Fuente: elaboración propia

Se identificó tres géneros bacterianos, los cuales corresponden a *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Micrococcus*, tal como se observa en la Figura 14.

El desarrollo de las colonias pertenecientes al género *Bacillus*, fue de 0.325 µm de tamaño, superficie lisa, consistencia cremosa, aspecto brillante, color beige, forma puntiforme, borde ondulado y elevación elevada; resultando una bacteria grampositiva de acuerdo a la tinción Gram realizada. En las pruebas bioquímicas realizadas reaccionó a TSI (positivo), LIA (negativo), Citrato de Simmons (negativo). En concordancia con estos hallazgos, Machaca (2017) identificó bacterias con similares características macroscópicas, demostrando el potencial de resistencia a metales pesados en muestras de agua del río Ramis, afectado por actividades mineras. De igual manera (Cáceda Quiroz et al., 2024) aislaron bacterias presentes en suelos contaminados metales pesados encontrando el género *Bacillus* que también tiene características macroscópicas muy similares a las encontradas en la presente investigación. Tales hallazgos nos demuestran que dentro de ambientes con características de contaminación tanto en agua y suelo, existe la presencia de microorganismos con características típicas.

El desarrollo de las colonias pertenecientes al género *Micrococcus* fue de 0.371 µm de tamaño, superficie lisa, consistencia cremosa, aspecto brillante, color beige, forma circular, borde entero y elevación convexa; resultando una bacteria gramnegativa de acuerdo a la tinción Gram realizada. La misma especie fue identificada en ambientes oligotróficos por Kim et al. (2025), lo que sugiere que esta bacteria puede desarrollarse tanto en condiciones de baja disponibilidad de nutrientes como en ecosistemas impactados por contaminantes de acuerdo a las características que presenta. Por ello podemos indicar que el microorganismo aislado es propio de este ambiente con las características particulares para su desarrollo.

El desarrollo de las colonias pertenecientes al género *Staphylococcus* fue de 0.383 µm de tamaño, superficie lisa, consistencia viscosa, aspecto brillante, color beige, forma circular, borde entero y elevación convexa; resultando una bacteria gramnegativa de acuerdo a la tinción Gram realizada. Tomando en cuenta Kumar et al. (2024), menciona acerca de la identificación de esta misma cepa en efluentes industriales; se sustentó en el análisis de sus características macroscópicas. Las variaciones en la morfología colonial (forma, tamaño, color y textura) reflejan la diversidad microbiana presente (Tabla 11), lo que podría asociarse a diferencias en la composición de las aguas residuales o en las

condiciones ambientales de origen. Si alguna de las muestras presenta menor crecimiento o ausencia de colonias resistentes, podría deberse a una menor presión selectiva por metales pesados o a la inhibición del crecimiento bacteriano por otros factores.

### **4.2.3 Pruebas bioquímicas**

Las cepas aisladas y purificadas exhibieron características microscópicas, de Tinción GRAM y pruebas bioquímicas reportadas en la Tabla 12.

Los resultados de la prueba de catalasa mostraron que la muestra M1 fue negativa, en contraste con las muestras M2 y S1, que fueron positivas. Proporciona una diferenciación crucial entre familias de bacterias y también como marcador metabólico entre aerobios y anaerobios.

Para la prueba de Oxidasa, las cepas bacterianas identificadas como M1, M2 y S1 nos muestra un resultado negativo a la prueba de oxidasa, S1 no presenta descarboxilación de la ornitina por ende nos da un resultado negativo, observa movilidad positiva e indol negativo, M2 presenta descarboxilación de la ornitina positiva formando así amina, movilidad negativo e indol negativo y M1 presenta descarboxilación de la ornitina positiva, movilidad negativo e indol negativo, por ende las bacterias pueden pertenecer a la familia Enterobacter. El resultado puede variar debido a que se usó un reactivo distinto.

Para la prueba de LIA, las cepas bacterianas identificadas como M1, M2 y S1 nos muestra un resultado negativo, por ende no se evidencian capacidad enzimática microbiana para la descarboxilación de lisina o arginina (y posterior alcalinización por aminas). El metabolismo de los microorganismos es exclusivamente aeróbico.

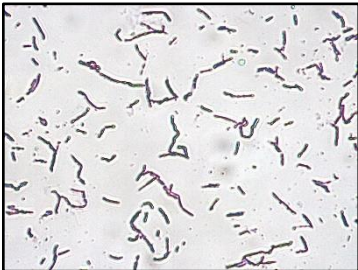
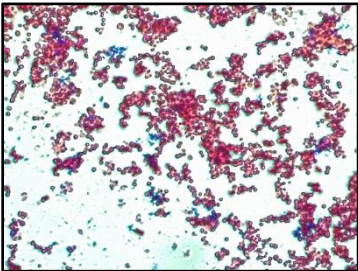
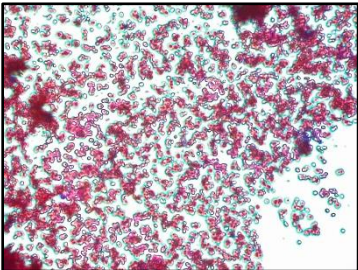
Para la prueba de TSI, la cepa bacteriana identificada como S1 lo cual nos muestra pico y fondo amarillo, se identifica un microorganismo capaz de fermentar lactosa, mientras que el metabolismo de las proteínas ocurre en la región superficial de la zona inclinada, área con alta disponibilidad de oxígeno. La acidez del medio provoca el cambio de coloración del indicador de pH, pasando de rojo a amarillo, M2 microorganismo que no fermenta glucosa, mostrando así el medio del mismo color indicando que no hay variación de pH, M1 el microorganismo realiza la utilización de glucosa de forma aerobia, por ende se descarta que M1 pertenezca a la familia Enterobacteriaceae. La identificación de esta cepa en efluentes industriales se basó en su caracterización bioquímica, según lo reportado por Kumar et al. (2024). En concordancia, Villota-

Calvachi y Otero-Ramírez (2009) determinaron diversos géneros bacterianos mediante la aplicación de pruebas bioquímicas en muestras de ambientes contaminados.

Para la prueba de Citrato de Simmons las cepas bacterianas identificadas como M1, M2 y S1 en los 3 casos nos muestran un resultado negativo a la prueba de Citrato Simmons, ya que los microorganismos no presentan utilización del citrato como fuente de carbono.

**Tabla 12.**

*Identificación del género bacteriano*

Cód.	Género	Características culturales - Colonia	Tinción Gram	Pruebas Bioquímicas
M1	<i>Bacillus</i>	<b>Forma:</b> Puntiforme <b>Margen:</b> Ondulado <b>Elevación:</b> Elevada <b>Superficie:</b> Lisa <b>Textura/Consistencia:</b> : Cremosa <b>Propiedad óptica:</b> Brillante <b>Tamaño:</b> 0.325 $\mu\text{m}$ <b>Conformación:</b> Concéntrica		<b>Catalasa:</b> - <b>Oxidasa:</b> - <b>LIA:</b> - <b>TSI:</b> + <b>Citrato</b> <b>Simmons:</b> -
M2	<i>Micrococcus</i>	<b>Forma:</b> Circular <b>Margen:</b> Entero <b>Elevación:</b> Convexa <b>Superficie:</b> Lisa <b>Textura/Consistencia:</b> : Cremosa <b>Propiedad óptica:</b> Brillante <b>Tamaño:</b> 0.371 $\mu\text{m}$ <b>Conformación:</b> Redonda		<b>Catalasa:</b> + <b>Oxidasa:</b> - <b>LIA:</b> - <b>TSI:</b> + <b>Citrato</b> <b>Simmons:</b> -
S1	<i>Staphylococcus</i>	<b>Forma:</b> Puntiforme <b>Margen:</b> Ondulado <b>Elevación:</b> Elevada <b>Superficie:</b> Lisa <b>Textura/Consistencia:</b> : Viscosa <b>Propiedad óptica:</b> Brillante <b>Tamaño:</b> 0.383 $\mu\text{m}$ <b>Conformación:</b> Redonda		<b>Catalasa:</b> + <b>Oxidasa:</b> - <b>LIA:</b> - <b>TSI:</b> + <b>Citrato</b> <b>Simmons:</b> -

*Nota.* Caracterización e identificación de cada microorganismo mediante morfología colonial, tinción de Gram y un perfil de pruebas bioquímicas. Fuente: elaboración propia.

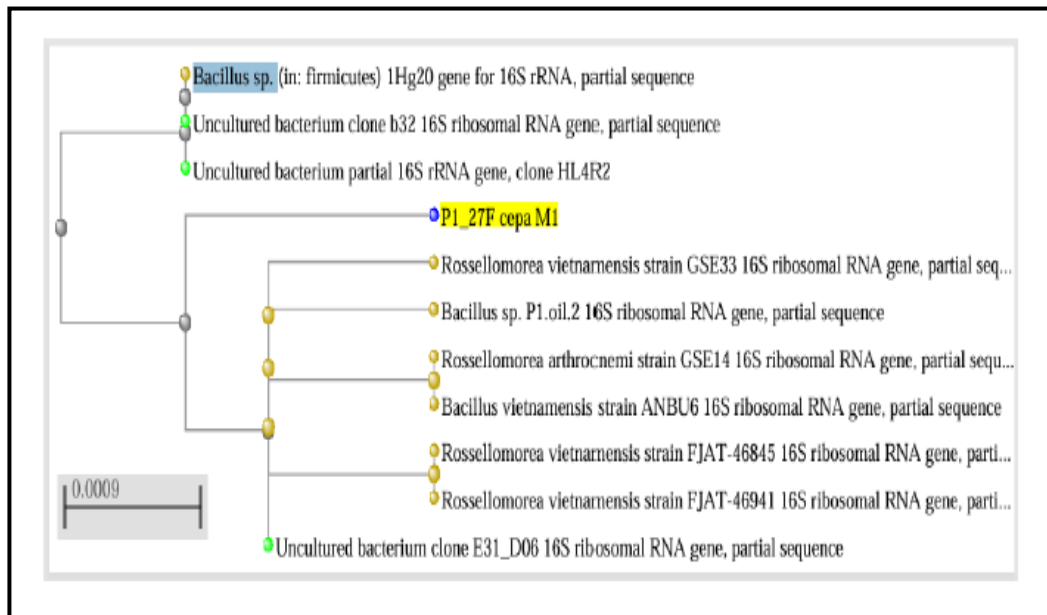
### 4.3 Amplificación y secuenciación de los microorganismos aislados

#### 4.3.1 Identificación molecular de la cepa M1

Realizada la secuencia se obtuvo lo siguiente para la cepa bacteriana M1, secuencia parcial 16S rRNA.

#### Figura 15

*Representación del árbol filogenético de la muestra M1*



*Nota.* Reconstrucción del árbol filogenético a partir de las secuencias del gen 16S rRNA para la secuencia M1. Fuente: elaboración propia.

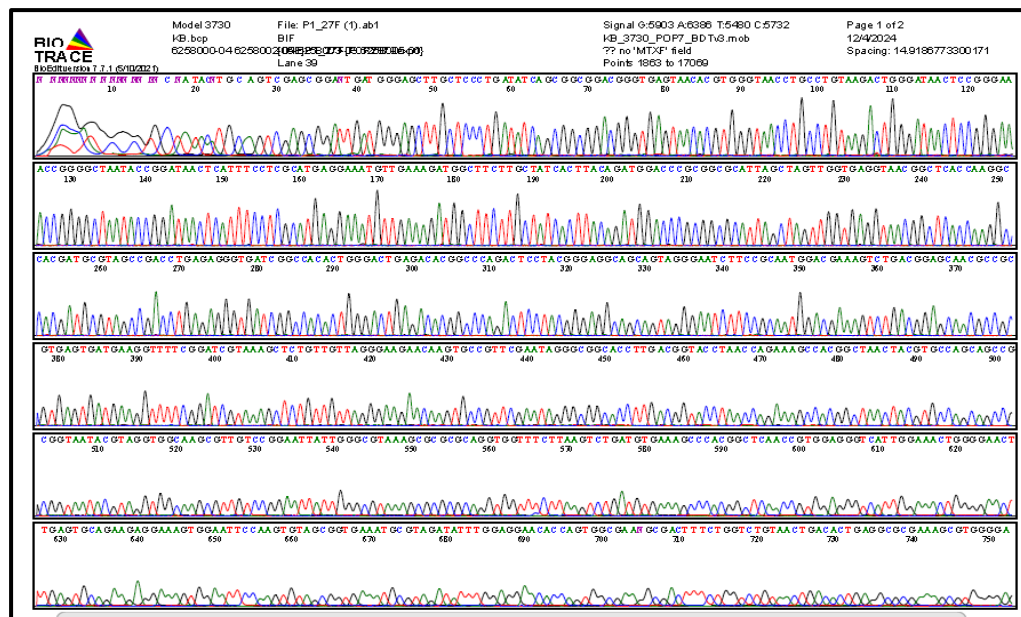
En la Figura 15, se muestra el análisis filogenético, basado en las secuencias del gen 16S rRNA, que reveló una clara agrupación de las cepas bacterianas según su relación evolutiva. Los aislados se agruparon en clados bien soportados, mostrando una estrecha relación con especies de los géneros *Bacillus* y *Rossellomorea*.

El género *Rossellomorea* fue reclasificado recientemente a partir del género *Bacillus*, lo que explica la similitud entre ambos. Esta bacteria es ambiental, típicamente encontrada en suelos y ambientes marinos, y no se considera patógena para humanos (Lee et al., 2023). La detección de secuencias asignadas a "bacteria no cultivada", indica la existencia de microorganismos filogenéticamente vinculados en ambientes naturales que aún no han sido aislados o descritos de forma completa (Villota-Calvachi & Otero-Ramírez, 2009). Si bien la secuenciación del gen 16S rRNA ofrece una identificación

robusta a nivel de género, la diferenciación entre especies de los géneros *Rosellomorea* y *Bacillus* podría necesitar enfoques adicionales, como el análisis de genes marcadores específicos o estudios fenotípicos complementarios.

## Figura 16

### *Electroferograma de la cepa M1*



*Nota.* Electroferograma de Cepa Bacteriana M1 fue analizada por electroforesis capilar en el secuenciador automático ABI 3730XL DNA Analyzer que transcribe los signos fluorescentes, graficado en BioEdit Sequence Alignment Editor (v7.7.1). Fuente: elaboración propia.

En la Figura 16, la región de alta confianza, donde la secuencia es clara y legible, abarca aproximadamente desde la base 20 hasta la base 750. Más allá de este punto, la señal se colapsa. Las intensidades de fluorescencia iniciales (G: 5903 A: 6386 T: 5480 C: 5732) están bien balanceadas. La señal para la Adenina (A) es ligeramente más alta, pero todas están en el mismo rango, lo que indica un buen inicio de la reacción de secuenciación (Ramírez-Salcedo et al., 2014).

En el rango de las posiciones 1 a 20 pb, la secuencia se compone de una serie de nucleótidos indeterminados (representados como "N"), lo cual es completamente normal y esperado. (Piaggio, 2007). Esta región corresponde al cebador de secuenciación (sequencing primer) y a los primeros nucleótidos donde la señal de secuenciación aún no se ha estabilizado. Por lo tanto, estos nucleótidos no forman parte de la secuencia de interés y deben excluirse del análisis.

En el rango de las bases 20 a 700, la secuencia presenta una zona de alta calidad. En esta región, los picos cromatográficos, se caracterizan por estar bien definidos y correctamente espaciados, con una línea base plana y estable que indica una ausencia significativa de ruido de fondo. Estas condiciones garantizan una elevada confiabilidad en la llamada de bases para la secuencia de interés (Ramírez Salcedo et al., 2014).

En el rango de las bases 700 a 750, se observa un decaimiento progresivo de la señal de secuenciación. En esta zona comienzan a aparecer nucleótidos indeterminados, los cuales corresponden a picos no resolubles o no identificables, así como ambigüedades en la secuencia (Cuadros et al., 2008). Este fenómeno se debe principalmente a la pérdida de sincronización de la polimerasa en fragmentos largos, lo que genera una disminución en la intensidad de los picos (signal decay). Como consecuencia, los picos se vuelven más bajos y anchos, produciendo solapamientos y comprometiendo la confiabilidad de la llamada de bases.

El análisis de secuencia mediante BLAST reveló una identidad del 99.6% con cepas del género *Bacillus sp.* y del 99.56% con la especie *Rossellomorea vietnamensis*, lo que sugiere una estrecha relación filogenética con este último taxón. Los hallazgos de esta investigación se alinean con estudios previos que destacan el papel de microorganismos resistentes en ambientes contaminados con metales pesados. Cáceda Quiroz et al. (2024) identificaron bacterias del género *Bacillus* en suelos mineros, coincidiendo con nuestros resultados y reforzando su prevalencia como indicador de resistencia en ecosistemas impactados. Esta similitud (96% en análisis bioinformáticos) sugiere una adaptación evolutiva compartida ante condiciones extremas, respaldada también por Sernaque Aguilar et al. (2019), quienes aislaron *Bacillus* en pozas artesanales contaminadas.

Un hallazgo relevante en nuestro estudio es la presencia de *Rossellomorea sp.*, un género con potencial oxidante de hierro, reportado previamente por Lee, Aziz & Tajarudin (2023) en aguas subterráneas con alta carga metálica. Nuestros análisis filogenéticos indican que la cepa estudiada podría representar una nueva especie dentro de este género, dado su clado separado. Esta hipótesis requiere validación mediante secuenciación completa del gen 16S rRNA, pero su capacidad metabólica similar a la descrita en la literatura sugiere un rol activo en la biorremediación, especialmente en la eliminación de metales mediante mecanismos como la oxidación y el consumo de materia orgánica como fuente de carbono.

Además, la resistencia a metales pesados observada en nuestra cepa encuentra paralelos con trabajos como el de Navarro Torre et al. (2021), quienes identificaron genes asociados a la biosíntesis de sideróforos y transportadores de ácido indol-3-acético en bacterias endófitas, mecanismos clave para la detoxificación. Esto refuerza la idea de que los microorganismos adaptados a ambientes hostiles desarrollan estrategias genéticas y metabólicas especializadas.

Un caso destacable es el de Yao et al. (2023), donde *Bacillus LBA119* demostró una eficiencia del 97,32% en la remoción de  $Hg^{2+}$ , combinando volatilización y adsorción. Nuestros resultados, aunque preliminares, apuntan a un potencial similar en *Rosellomorea* sp., lo que abre perspectivas para su aplicación en biorremediación de suelos y aguas con mercurio u otros metales. La capacidad de adaptación a condiciones extremas como pH alcalino y alta salinidad (evidenciado en nuestros parámetros físico-químicos) respalda su utilidad en entornos mineros.

#### Implicancias y Perspectivas

La posible novedad taxonómica de la cepa estudiada subraya la necesidad de caracterización genómica completa, incluyendo genes de resistencia y vías metabólicas. Su perfil resistente y versátil la posiciona como candidata para estrategias de biorremediación in situ, complementando enfoques como los propuestos por Yao et al. (2023) para suelos mercuriales. Futuros estudios deberán evaluar su eficiencia en condiciones reales, así como su interacción con otros microorganismos y contaminantes.

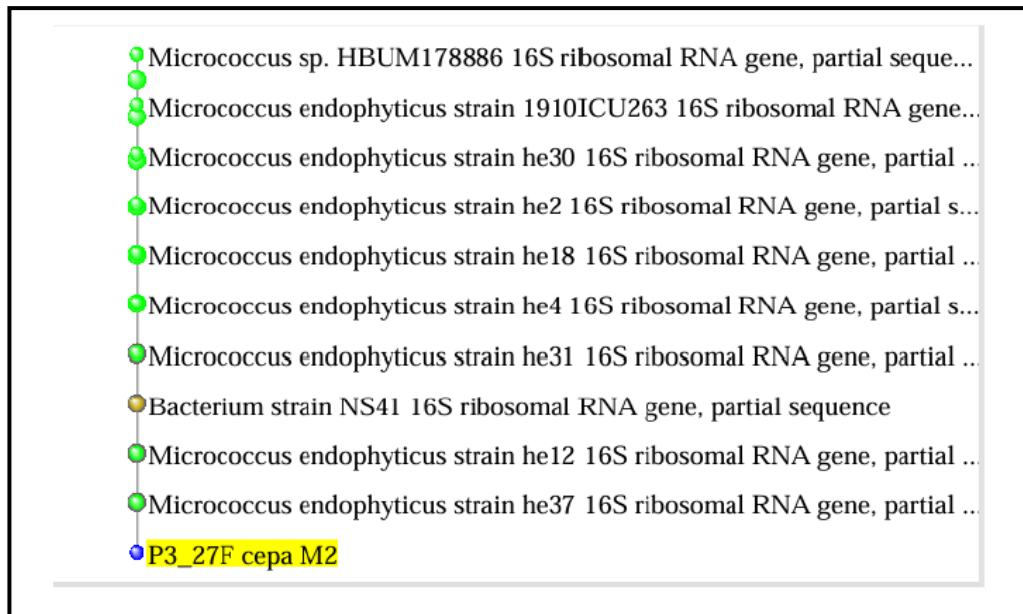
En conclusión, esta investigación contribuye al creciente cuerpo de evidencia sobre bacterias resilientes en ambientes contaminados, resaltando su diversidad y potencial biotecnológico. La combinación de herramientas moleculares y experimentales —como las empleadas aquí— es clave para descubrir y aprovechar estos recursos microbianos en la restauración ambiental.

#### **4.3.2 Identificación molecular de la cepa M2**

Realizada la secuencia se obtuvo lo siguiente para la cepa bacteriana M2, secuencia parcial 16S rRNA.

## Figura 17

Representación del árbol filogenético de la muestra M2



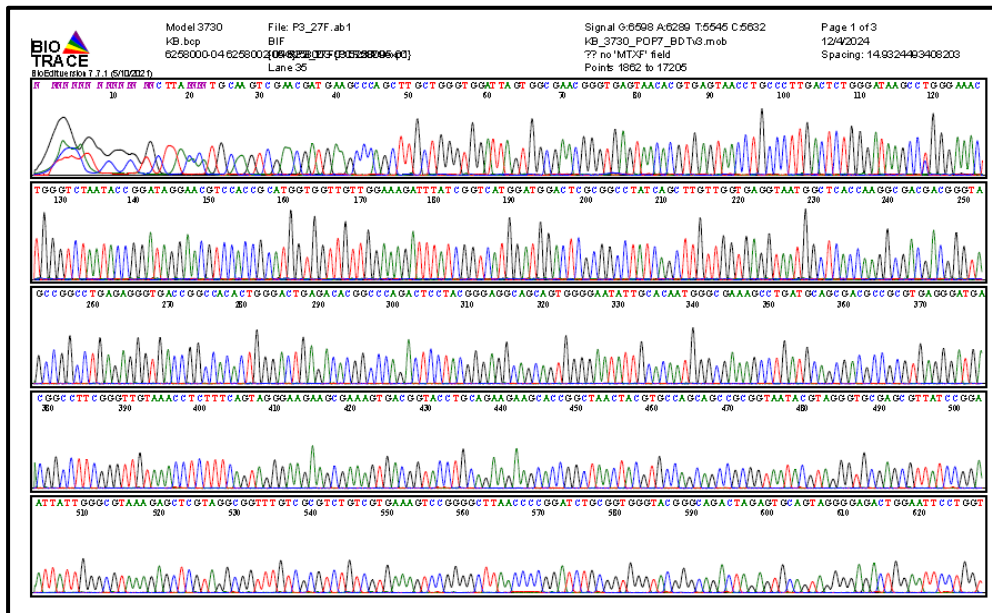
*Nota.* Reconstrucción del árbol filogenético a partir de las secuencias del gen 16S rRNA para la secuencia M2. Fuente: elaboración propia.

En la Figura 17, el análisis de la secuencia parcial del gen 16S rRNA de la cepa M2 (amplificada con el iniciador 27F) reveló una alta similitud con secuencias del género *Micrococcus*. La mayor homología se observó con cepas de *Micrococcus endophyticus* y con *Micrococcus sp.* HBUM178886, lo que sugiere que la cepa M2 pertenece a la especie *Micrococcus endophyticus*.

Esta bacteria es de origen ambiental y ha sido reportada como endófito, lo que coincide con su perfil no patógeno en humanos. La robustez del gen 16S rRNA para identificación taxonómica a nivel de género y especie está ampliamente validada (Rodríguez, 2019).

## Figura 18

### Electroferograma de la cepa M2



*Nota.* Electroferograma de Cepa Bacteriana M2 fue analizada por electroforesis capilar en el secuenciador automático ABI 3730XL DNA Analyzer que transcribe los signos fluorescentes, graficado en BioEdit Sequence Alignment Editor (v7.7.1). Fuente: elaboración propia.

En la Figura 18, se presenta la descripción y análisis del electroferograma obtenido mediante secuenciación, corresponde a la muestra M2, amplificada con el iniciador 27F. En el rango de posiciones (1 a 500 pb), dentro de esta región inicial del electroferograma presenta una alta calidad de secuenciación, con señales de fluorescencia intensas y bien resueltas para todas las bases (G: 6598, A: 6289, T: 5545, C: 5632). (Ramírez-Salcedo et al., 2014). Los picos son claros y las ambigüedades ("N") son mínimas y aisladas, lo que indica una excelente confiabilidad en la asignación de nucleótidos. Esta zona es ideal para análisis filogenéticos y de identificación microbiana, ya que abarca segmentos conservados e hipervariables del gen 16S rRNA, como la región V1–V2 (Cuadros et al., 2008).

En la región (500 a 950 pb), a partir de la posición 500, se observa una degradación gradual en la calidad de la secuencia. La intensidad de los picos disminuye progresivamente, y las ambigüedades ("N") comienzan a aparecer con mayor frecuencia, especialmente hacia el final de este. Se muestra la secuencia que aún es interpretable, pero con una la señal débil y las bases poco determinadas para el análisis (Piaggio, 2007).

En la región final del electroferograma presenta pérdida severa de resolución y confiabilidad. La señal de fluorescencia es extremadamente débil, con superposición masiva de picos y abundantes bases ambiguas ("N"). Esta zona no es apta para análisis biológico. Se atribuye este deterioro a limitaciones técnicas inherentes al método de secuenciación para fragmentos largos (Ramírez-Salcedo et al., 2014).

El análisis de alineamiento de secuencias mediante BLAST reveló una identidad del 100% con la cepa tipo de *Micrococcus endophyticus*, lo que confirma la asignación taxonómica a esta especie. Los estudios analizados revelan las notables capacidades adaptativas de bacterias de los géneros *Kocuria* y *Micrococcus* en dos contextos ecológicos distintos pero complementarios: la producción de enzimas en condiciones oligotróficas y la resistencia a metales pesados en ambientes contaminados. El trabajo de Kim et al. (2025) demuestra que *Kocuria rosea* y *Micrococcus endophyticus* aisladas del Área de Conservación Comunitaria de Guassa poseen una destacada actividad de capacidad de degradar almidón, evidenciada por halos de hidrólisis de hasta 20 mm de diámetro. Esta capacidad enzimática resulta particularmente valiosa considerando el origen de los aislamientos - un entorno con probable limitación de nutrientes - lo que sugiere que estas cepas han desarrollado estrategias metabólicas eficientes para aprovechar sustratos complejos como el almidón.

Los hallazgos de Arroyo Herrera et al. (2023) complementan esta perspectiva al revelar los sofisticados mecanismos de resistencia a metales pesados en cepas de *Micrococcus luteus*. El análisis genómico comparativo demostró que estas cepas poseen un repertorio ampliado de genes de resistencia en comparación con cepas de referencia, incluyendo sistemas especializados para la biotransformación de arsénico. La presencia de una vía citoplasmática dependiente de tiorredoxina para la reducción de  $As^{5+}$  a  $As^{3+}$ , junto con los cambios observados en los perfiles de ácidos orgánicos, sugiere una adaptación metabólica integral a ambientes altamente contaminados por metales pesados.

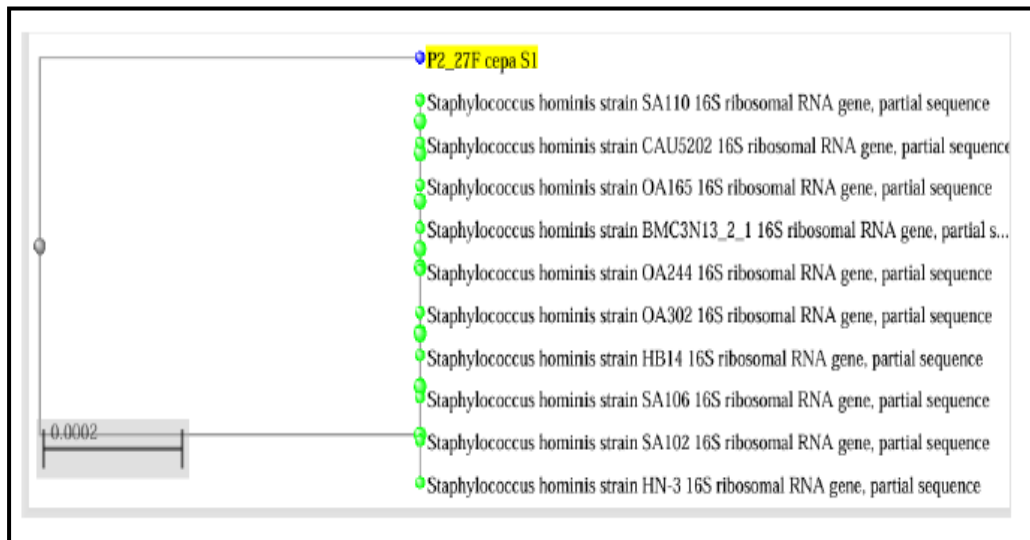
Los trabajos analizados destacan el potencial de bacterias ambientales como fuente de soluciones biotecnológicas para dos desafíos globales: la necesidad de procesos industriales más sostenibles y la remediación de ambientes contaminados. La convergencia de adaptaciones metabólicas y sistemas de resistencia en estos microorganismos subraya la importancia de explorar ecosistemas extremos como fuente de recursos microbianos.

### 4.3.3 Identificación molecular de la cepa S1

Realizada la secuencia se obtuvo lo siguiente para la cepa bacteriana S1, secuencia parcial 16S rRNA.

**Figura 19**

*Representación de árbol filogenético para la muestra S1*

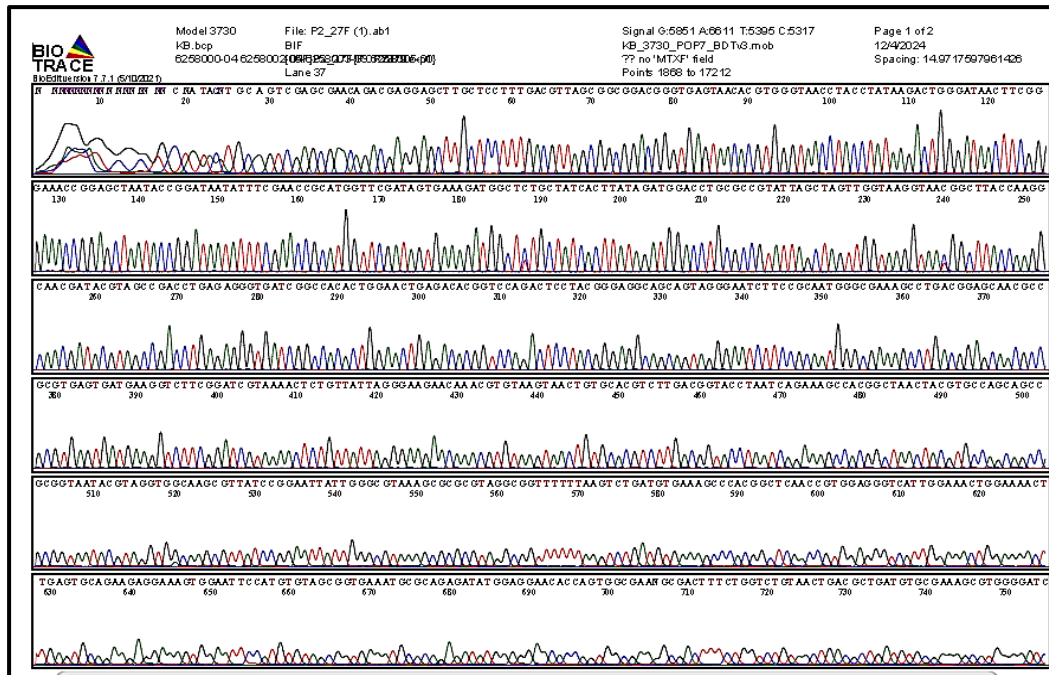


*Nota.* Reconstrucción del árbol filogenético a partir de las secuencias del gen 16S rRNA para la secuencia S1. Fuente: elaboración propia.

La identificación de la cepa S1 como *Staphylococcus hominis* está confirmada por una comparación genética que muestra una similitud del 99.89% o superior con otras cepas de la especie. La baja distancia genética (0.0002) calculada a partir de las secuencias del gen 16S rRNA refuerza este resultado.

**Figura 20**

*Electroferograma de la cepa S1.*



esporádica de ambigüedades. Siendo posible interpretar la mayoría de las bases, de los fragmentos como 600-620 pb (CATTGGAACTGGAAAACCT) mantienen cierta claridad, pero la señal decae hacia el final del intervalo.

En la región final, muestra una transición a baja calidad. La resolución se deteriora significativamente, con ambigüedades frecuentes y superposición de picos; la señal de fluorescencia es débil y bases como las de 890-900 pb son poco confiables. Esta región requiere truncamiento o validación con lecturas complementarias.

El análisis de secuenciación del gen 16S rRNA mediante BLAST mostró un 99.89% de identidad con *Staphylococcus hominis*, lo que sugiere una alta probabilidad de pertenencia a esta especie; estos resultados respaldan la utilidad del marcador 16S rRNA para estudios de diversidad microbiana. Los estudios analizados demuestran consistentemente la capacidad de diversas cepas bacterianas, particularmente del género *Staphylococcus*, para tolerar y acumular metales pesados en ambientes contaminados. Santana-Flores et al. (2020) y Machaca (2017) identificaron cepas de *Staphylococcus* resistentes a concentraciones significativas de mercurio y plomo, destacando la prevalencia de este género en ecosistemas impactados por contaminación metálica. Estos hallazgos coinciden con los de Kumar et al. (2024), quienes reportaron una eficiencia de bioacumulación superior al 90% para cadmio y plomo en *Staphylococcus epidermidis*.

El proceso de aislamiento y caracterización de estas cepas revela patrones metodológicos comunes pero con adaptaciones específicas. Machaca (2017) implementó un enfoque clásico de microbiología ambiental, utilizando medios selectivos (Agar Müeller Hinton) y pruebas bioquímicas convencionales, complementado con ensayos de resistencia a diferentes concentraciones de metales. Este método permitió cuantificar las unidades formadoras de colonias ( $1.09 \times 10^3$  a  $2.55 \times 10^5$  UFC/ml) en función de la profundidad del muestreo, evidenciando gradientes verticales en la distribución bacteriana.

Por su parte, Kumar et al. (2024) emplearon técnicas moleculares más avanzadas, incluyendo secuenciación del gen 16S rRNA y análisis por ICP-MS/EDX, que proporcionaron información precisa sobre los mecanismos de acumulación intracelular. La combinación de estos enfoques tradicionales y modernos subraya la importancia de metodologías complementarias para comprender completamente los procesos de resistencia y bioacumulación.

La consistencia de los resultados a través de diferentes estudios (Santana Flores et al. 2020; Machaca 2017; Kumar et al. 2024) refuerza la hipótesis de que *Staphylococcus spp.* ha desarrollado adaptaciones evolutivas particulares para prosperar en ambientes con alta presión selectiva por metales pesados, convirtiéndose en candidatos prometedores para tecnologías de remediación ambiental.

Propuesta de investigación aplicada: Desarrollo de un consorcio bacteriano nativo para la biorremediación de relaves mineros en La Rinconada – Puno

Los resultados obtenidos en este estudio permiten plantear como propuesta el desarrollo de un consorcio bacteriano compuesto por las cepas nativas *Rosellomorea sp.*, *Micrococcus endophyticus* y *Staphylococcus hominis*, aisladas directamente de los relaves mineros del centro poblado La Rinconada, con el objetivo de aplicar estrategias de biorremediación específicas y eficientes frente a la problemática de contaminación por metales pesados en esta zona. Estas cepas, identificadas molecularmente mediante secuenciación del gen 16S rRNA, han demostrado un alto grado de adaptabilidad a condiciones ambientales extremas, todos característicos de los pasivos ambientales generados por la minería informal e intensiva en la región.

La cepa *Rosellomorea sp.* mostró características filogenéticas que sugieren su pertenencia a una posible nueva especie, con capacidades potenciales de oxidación de hierro y resistencia a metales pesados, lo que la posiciona como una especie clave en procesos de transformación de metales en formas menos tóxicas o más fácilmente removibles. Por su parte, *Micrococcus endophyticus* se caracteriza por su resistencia natural a ambientes empobrecidos en nutrientes (oligotróficos), manteniendo una actividad metabólica eficiente que podría permitir su participación en la estabilización de materia orgánica y formación de biopelículas útiles para la inmovilización de metales. Finalmente, *Staphylococcus hominis* presentó una alta homología con cepas resistentes a metales como plomo y mercurio, con indicios de poseer mecanismos de bioacumulación intracelular, lo cual la convierte en un componente funcional esencial para la retención y concentración de metales dentro del sistema biológico propuesto.

La sinergia entre estas cepas, nativas del mismo ambiente contaminado, sugiere que podrían operar de manera colaborativa en un sistema de biorremediación, ya sea in situ (directamente en los relaves) o ex situ (en reactores o biofiltros), aumentando la eficiencia de eliminación o transformación de metales sin introducir organismos foráneos. Esta

propuesta no solo aprovecha el potencial adaptativo de microorganismos autóctonos, sino que también representa una solución sostenible, económica y ecológicamente viable para la región, considerando que emplea recursos biológicos locales adaptados a las condiciones reales del entorno.

En conjunto, esta propuesta busca sentar las bases para el diseño de tecnologías de remediación microbiana aplicables en zonas altoandinas afectadas por la minería, alineándose con principios de conservación ambiental, aprovechamiento de la biodiversidad microbiana y participación de conocimientos científicos en la solución de problemáticas socioambientales locales.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 Conclusiones

Los resultados de la caracterización fisicoquímica de los relaves mineros en La Rinconada confirman un estado de alta contaminación ambiental. Estos se manifiestan en condiciones extremas, como pH superior a 10, conductividad eléctrica elevada (1350–1410  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) y temperaturas notablemente bajas (5.7–6.8 °C). Destaca, la concentración de mercurio, que alcanza 330.1372 mg/L, un valor que excede en 165,000 veces el límite permisible.

El análisis microbiológico de los relaves mineros de La Rinconada permitió aislar microorganismos con una notable diversidad y adaptación a condiciones extremas, particularmente a la presencia de metales pesados como el mercurio. Macroscópicamente, las colonias M1, M2 y S1 mostraron diferencias significativas en morfología, pigmentación, textura y tamaño. Microscópicamente, se identificaron tanto bacterias Gram positivas (M1) como Gram negativas (M2, S1).

La amplificación y secuenciación del gen 16S rRNA permitió identificar con alta precisión en las tres cepas bacterianas aisladas de relaves mineros; identificando la cepa M1 con 99.6% de similitud al género *Rosellomorea*; la cepa M2 fue identificada como *Micrococcus endophyticus* con 100% de similitud y finalmente, la cepa S1 mostró un 99.89% de similitud con *Staphylococcus hominis*.

#### 5.2 Recomendaciones

- Continuar el muestreo en diferentes puntos geográficos y profundidades del relave para ampliar la diversidad microbiana aislada, lo que permitiría identificar nuevas cepas con potencial de resistencia a metales pesados. Y complementar ensayos de resistencia a concentraciones graduales de metales pesados, producción de sideróforos, y tolerancia a estrés osmótico o pH extremo.
- Realizar una secuenciación completa del genoma de las cepas más prometedoras, especialmente de *Rosellomorea* sp., a fin de confirmar si se trata de una nueva especie y comprender mejor los genes asociados a mecanismos de resistencia y biorremediación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- American Public Health Association- APHA. (2017). *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water* (American Water Works Association). Water Environment Federation.
- American Society for Microbiology. (2022). *Microbes and climate change – science, people & impacts*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK580166/>
- Angon, P. B., Islam, Md. S., Kc, S., Das, A., Anjum, N., Poudel, A., & Suchi, S. A. (2024). Sources, effects and present perspectives of heavy metals contamination: Soil, plants and human food chain. *Heliyon*, 10(7), e28357. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e28357>
- Aquihuatl, M., Volke, T., Prado, L., Shirai, K., Ramírez, F., & Salazar, M. (2012). *Manual de prácticas de laboratorio microbiología general*. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. México DF.
- Arenas Delgado, A. (2018). *Aislamiento y Caracterización Molecular 16S rRNA de Cepas Bacterianas con Capacidad de Biodegradación de PEAD (Polietileno de Alta Densidad) Micro Contaminante en Aguas Sintéticas a Escala Laboratorio* [Universidad Católica de Santa María]. <https://repositorio.ucsm.edu.pe/items/15080fb1-4a97-411e-a390-7e8e6eccc22d>
- Arrieta, O. M. R., Rivera, A. P. R., Rojano, B., Ruiz, O., Correa, G. M., Cienfuegos, A. V. G., Arias, L., & Cardona, S. A. G. (2012). Caracterización fenotípica y molecular de poblaciones bacterianas aisladas de un suelo contaminado con diesel y sometido a dos tecnologías de biorremediación. *Gestión y Ambiente*, 13(3), 65-76.
- Arruda, A., Ferreira, G. E., Santos Júnior, A., Matos, N. B., Carvalho, T. S., Ozaki, L. S., Stabeli, R. G., & Silva, A. A. (2021). Diversity of culturable bacteria isolated from the

- feces of wild *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) mosquitoes from the Brazilian Amazon. *Journal of Medical Entomology*, 58(4), 1900-1907. <https://doi.org/10.1093/jme/tjab028>
- Avalos, A. A., Mamani, F. H., Maquera, A. J. F. A., Gomez, E. H. T., Quispe, E. D. C., Valdivia, G. A. T., & Valdivia, H. M. H. (2024). Análisis de la degradación ambiental en la cabecera de la cuenca del Titicaca: Impacto sobre las fuentes de agua y suelo. En *Geología de Ingeniería e Ambiental: Análisis, métodos e técnicas en pesquisa* (1.<sup>a</sup> ed., pp. 7-23). Editora Científica Digital. <https://doi.org/10.37885/240516538>
- Bador, J., Nicolas, B., Chapuis, A., Varin, V., Dullier-Taillefumier, N., De Curraize, C., Amoureux, L., Putot, A., & Neuwirth, C. (2020). 16S rRNA PCR on clinical specimens: Impact on diagnosis and therapeutic management. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 50(1), 63-73. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2019.09.014>
- Baykal, P. I., Łabaj, P. P., Markowetz, F., Schriml, L. M., Stekhoven, D. J., Mangul, S., & Beerenwinkel, N. (2024). Genomic reproducibility in the bioinformatics era. *Genome Biology*, 25(1), 213. <https://doi.org/10.1186/s13059-024-03343-2>
- Belmar, R., & Alfonso, V. (2018). Microorganismos extremófilos. Psicrófilos y sus mecanismos de adaptación. *Nature*, 409, 092-1101.
- Biosearch Technologies. (2024). *MasterPure Complete DNA and RNA Purification Kit*. Izasa Scientific by Palex.
- Brousett-Minaya, M. A., Rondan-Sanabria, G. G., Chirinos-Marroquí, M., & Biamont-Rojas, I. (2021). Impacto de la minería en aguas superficiales de la Región Puno-Perú. *Fides Et Ratio*, 21(21), 187-207.
- Budowle, B., Connell, N. D., Bielecka-Oder, A., Colwell, R. R., Corbett, C. R., Fletcher, J., Forsman, M., Kadavy, D. R., Markotic, A., Morse, S. A., Murch, R. S., Sajantila, A., Schmedes, S. E., Ternus, K. L., Turner, S. D., & Minot, S. (2014). Validation of high

- throughput sequencing and microbial forensics applications. *Investigative Genetics*, 5, 1-18. <https://doi.org/10.1186/2041-2223-5-9>
- Buxton, A. (with International Institute for Environment and Development). (2013). *Responding to the challenge of artisanal and small-scale mining: How can knowledge networks help?* International Institute for Environment and Development.
- Cacciuttolo, C., Cano, D., & Custodio, M. (2023). Socio-environmental risks linked with mine tailings chemical composition: Promoting responsible and safe mine tailings management considering copper and gold mining experiences from Chile and Peru. *Toxics*, 11(5), 462. <https://doi.org/10.3390/toxics11050462>
- Cáceda Quiroz, C. J., Maraza Choque, G. J., Chachaque Callo, D. M., Fora Quispe, G. de L., Farfan Pajuelo, D. G., & Carpio Mamani, M. (2024). Aislamiento y caracterización filogenética de bacterias nativas cultivables procedentes de minas abandonadas en Tacna, Perú. *Biocencia*, 26. <https://doi.org/10.18633/biocencia.v26.2130>
- Casares, M. V. (2012). *Biodisponibilidad y toxicidad de metales pesados en aguas naturales con características físico-químicas extremas: Bases para su monitoreo y remediación*. [Doctoral, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.]. [https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n5334\\_Casares](https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n5334_Casares)
- Castañé, P., Topalián, M., Cordero, R., & Salibián, A. (2003). Influencia de la especiación de los metales pesados en medio acuático como determinante de su toxicidad. *Revista de Toxicología*, 20(1), 13-18.
- Castresana, J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution*, 17, 540-552. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334>
- Ccancapa, Y. R. (2015). *Contaminación del agua superficial y sedimentos por mercurio en la rinconada, originado por la minería informal (Ananea- Puno)* [Universidad Nacional

del

Altiplano].

[https://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14082/1908/CCANCAPA\\_SALCEDO\\_YENNY\\_ROSA.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14082/1908/CCANCAPA_SALCEDO_YENNY_ROSA.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Cervantes, C., Espino-Saldaña, A., Acevedo-Aguilar, F., León-Rodríguez, I., Rivera-Cano, M., Avila-Rodríguez, M., Wróbel-Kaczmarczyk, K., Wróbel-Zasada, K., Gutiérrez-Corona, J., Rodríguez-Zavala, J., & Moreno-Sánchez, R. (2006). Interacciones microbianas con metales pesados. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48(2), 203-210.

Cervera, S. A. S. (2011). *Prácticas de microbiología*. Universidad de La Rioja, Servicio de Publicaciones; 978-84-694-0870-4.

Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N., & Alland, D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 69, 330-339. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.02.005>

Chiner-Oms, A., & González-Candelas, F. (2016). EvalMSA: A program to evaluate multiple sequence alignments and detect outliers. *Evolutionary Bioinformatics*, 12. <https://doi.org/10.4137/EBO.S40583>

Choi, R. Y., Coyner, A. S., Kalpathy-Cramer, J., Chiang, M. F., & Campbell, J. P. (2020). Introduction to machine learning, neural networks, and deep learning. *Translational vision science & technology*, 9(2), 14. <https://doi.org/10.1167/tvst.9.2.14>

Church, D. L., Cerutti, L., Gürtler, A., Griener, T., Zelazny, A., & Emler, S. (2020). Performance and application of 16S rRNA gene cycle sequencing for routine identification of bacteria in the clinical microbiology laboratory. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(4), e00053-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00053-19>

Clesceri, L. S. (1998). *Standard methods for examination of water and wastewater* (Vol. 9). American public health association.

- Comisión para el desarrollo minero sostenible. (2020). *Informe final de la comisión para el desarrollo minero sostenible*.  
<https://cdn.www.gob.pe/uploads/document/file/3456252/POL%C3%8DTICA%20NACIONAL%20MULTISECTORIAL%20PARA%20LA%20PEQUE%C3%91A%20MINER%C3%8DA%20Y%20MINER%C3%8DA%20ARTESANAL.pdf.pdf>
- Consortio de Investigación Económica y Social (CIES). (2021). *Proyecto Perú Debate 2021: Propuestas hacia un mejor gobierno*. Biblioteca Nacional del Perú.  
[https://cies.org.pe/wp-content/uploads/2021/04/18.\\_dp\\_medio\\_ambiente.pdf](https://cies.org.pe/wp-content/uploads/2021/04/18._dp_medio_ambiente.pdf)
- Cortés-López, N. G., Ordóñez-Baquera, P. L., & Domínguez-Viveros, J. (2020). Herramientas moleculares utilizadas para el análisis metagenómico. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 11(4), 1150-1173. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i4.5202>
- Craun, G. F., & Calderon, R. L. (2001). Waterborne disease outbreaks caused by distribution system deficiencies. *Journal AWWA*, 93(9), 64-75. <https://doi.org/10.1002/j.1551-8833.2001.tb09287.x>
- Cuadros, J., Paredes, J. L., & Ceballos, G. (2008). Herramienta de software para el análisis de datos electroforéticos. *Mecánica Computacional*, 44, 3299-3315.
- Custodio, M., Chanamé, F., Pizarro, S., & Cruz, D. (2018). Quality of the aquatic environment and diversity of benthic macroinvertebrates of high Andean wetlands of the Junín region, Peru. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 44(3), 195-202.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejar.2018.08.004>
- Devlin, T. M. (2021). 7.2 La reacción en cadena de la polimerasa. En *Bioquímica con aplicaciones clínicas* (Vol. 1, p. 280).  
<https://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=JgBMEAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA280&dq=Extracci%C3%B3n+de+ADN+y+reacci%C3%B3n+en+cadena+de+la+p>

olimerasa&ots=rEm5meW-D9&sig=aeXjgUUP16YOJMdzgv7d-  
7ZyKL4&redir\_esc=y#v=onepage&q&f=false

- Dhakar, K., & Pandey, A. (2016). Wide pH range tolerance in extremophiles: Towards understanding an important phenomenon for future biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*, 2499-2510. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7285-2>
- Di Franco, A., Poujol, R., Baurain, D., & Philippe, H. (2019). Evaluating the usefulness of alignment filtering methods to reduce the impact of errors on evolutionary inferences. *BMC Evolutionary Biology*, *19*(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s12862-019-1350-2>
- Eren, K., Taktakoğlu, N., & Pirim, I. (2023). DNA Sequencing Methods: From Past to Present. *The Eurasian Journal of Medicine*, *54*. <https://doi.org/10.5152/eurasianjmed.2022.22280>
- GEF. (2018). *Mercury-free mining: UNDP, GEF and the Government of Peru work together to reduce the use of mercury in artisanal and small-scale gold mining*. Global Environment Facility GEF.
- Ghannam, R. B., & Techtmann, S. M. (2021). Machine learning applications in microbial ecology, human microbiome studies, and environmental monitoring. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *19*, 1092-1107. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.01.028>
- Gongora Flores, J. J. (2021). *Aislamiento y caracterización molecular de consorcios bacterianos nativos obtenidos del distrito Mariano Nicolás Valcárcel anexo de Secocha como alternativa para la biorremediación de agua contaminada por metales pesados* [Universidad Católica de Santa María]. <https://repositorio.ucsm.edu.pe/items/ed8ae243-6877-411e-98b2-704c89d42d89>

- Gutlerner, J. (2015). Beyond “publish or perish”. *Science*, 350(6256), 49.  
<https://doi.org/10.1126/ciencia.aac7868>
- Hassler, H. B., Probert, B., Moore, C., Lawson, E., Jackson, R. W., Russell, B. T., & Richards, V. P. (2022). Phylogenies of the 16S rRNA gene and its hypervariable regions lack concordance with core genome phylogenies. *Microbiome*, 10, 104.  
<https://doi.org/10.1186/s40168-022-01295-y>
- Hinojosa-Carrasco, O. (2016). Concentração gravimétrica de minerais auríferos. *Rev. Met. UTO*, 38, 38-50.
- Houdt, R. V., Monsieurs, P., Mijndonckx, K., Provoost, A., Janssen, A., Mergeay, M., & Leys, N. (2012). Variation in genomic islands contribute to genome plasticity in *Cupriavidus metallidurans*. *BMC Genomics*, 13, 111. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-111>
- Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., & Dinh, A. (2021). Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human Immunology*, 82(11), 801-811.  
<https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.012>
- INEI. (2022). *Perú: Anuario de estadísticas ambientales 2022*.  
[https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones\\_digitales/Est/Lib1877/libro.pdf](https://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/publicaciones_digitales/Est/Lib1877/libro.pdf).
- Iwen, P. C., Hinrichs, S. H., & Rupp, M. E. (2002). Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Medical Mycology*, 40, 87-109. <https://doi.org/10.1080/mmy.40.1.87.109>
- Johnson, J. S., Spakowicz, D. J., Hong, B.-Y., Petersen, L. M., Demkowicz, P., Chen, L., Leopold, S. R., Hanson, B. M., Agresta, H. O., Gerstein, M., Sodergren, E., & Weinstock, G. M. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and

- strain-level microbiome analysis. *Nature Communications*, 10(1), 5029.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>
- Kahhat, R., Parodi, E., Larrea-Gallegos, G., Mesta, C., & Vázquez-Rowe, I. (2019). Environmental impacts of the life cycle of alluvial gold mining in the Peruvian Amazon rainforest. *Science of The Total Environment*, 662, 940-951.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.246>
- Kumar, A., Mukherjee, G., Ahuja, V., Gupta, S., Tarighat, M. A., & Abdi, G. (2024). Biosorption and transformation of cadmium and lead by *Staphylococcus epidermidis* AS-1 isolated from industrial effluent. *BMC Microbiology*, 24(1), 420.  
<https://doi.org/10.1186/s12866-024-03568-y>
- Lalangui Pulla, L. F., Méndez Taco, D. S., & Jimenez, S. (2021). *Caracterización de relaves mineros para su aprovechamiento en la fabricación de materiales de construcción* [Tesis doctoral]. Escuela Superior Politécnica del Litoral.
- Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., & Pace, N. R. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82, 6955-6959.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.82.20.6955>
- Larsson, A. (2014). AliView: A fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics*, 30, 3276-3278. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531>
- Lee, W. S., Aziz, H. A., & Tajarudin, H. A. (2023). Removal of Fe and Mn from the groundwater by using zeolite with *Rosellomorea* sp. *Water Environment Research*, 98(5), e10913. <https://doi.org/10.1002/wer.10913>
- León, D. H. (2023). *Biosorción de metales pesados totales de agua residual de la mina La Rinconada con biomasa de Waraqqo (Echinopsis maximiliana)* [Universidad Nacional de Altiplano].

[https://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14082/22166/Leon\\_Hancco\\_Delfin.pdf?sequence=4&isAllowed=y](https://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14082/22166/Leon_Hancco_Delfin.pdf?sequence=4&isAllowed=y)

Liang, L., Wang, P., Zhao, X., He, L., Qu, T., & Chen, Y. (2022). Single-molecule real-time sequencing reveals differences in bacterial diversity in raw milk in different regions and seasons in China. *Journal of Dairy Science*, *105*(7), 5669-5684. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21445>

Llambí, L. D., Becerra, M. T., Peralvo, M., Avella, A., Baruffol, M., & Díaz, L. J. (2019). Monitoring biodiversity and ecosystem services in Colombia's high andean ecosystems: Toward an integrated strategy. *Mountain Research and Development*, *39*(3). <https://doi.org/10.1659/MRD-JOURNAL-D-19-00020.1>

Lobato Flores, A. L. (2013). *Evaluación ambiental y programas de remediación de la cuenca alta del río ramis*. [Universidad Nacional de Ingeniería]. <http://hdl.handle.net/20.500.14076/1079>

López, C. C., González, C. F., Tomás, M. C., & Oliver, A. P. (2021). *Aplicaciones de las técnicas de secuenciación masiva en la Microbiología Clínica. Procedimientos en Microbiología Clínica*. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimiento71.pdf>

Loza del Carpio, A. L., & Ccancapa Salcedo, Y. (2020). Mercurio en un arroyo altoandino con alto impacto por minería aurífera artesanal (La Rinconada, Puno, Perú). *Revista internacional de contaminación ambiental*, *36*(1), 33-44. <https://doi.org/10.20937/RICA.2020.36.53317>

- Machaca, E. D. Q. (2017). Resistencia in vitro al plomo y mercurio por la comunidad bacteriana de las aguas del río Ramis – Puno, Perú. *Revista de Investigaciones*, 6(3), 202-212. <https://doi.org/10.26788/riepg.v6i3.109>
- Marcos-Merino, J. M., Gallego, R. E., & Ochoa De Alda, J. G. (2019). Extracción de ADN con material cotidiano: Desarrollo de una estrategia interdisciplinar a partir de sus fundamentos científicos. *Educación Química*, 30(1). <https://doi.org/10.22201/fq.18708404e.2019.1.65732>
- Marín, R. (2003). Físicoquímica y microbiología de los medios acuáticos. Tratamiento y control de calidad de aguas. *Ediciones Díaz de Santos, S. A.*
- Martinez, J., & Casallas, M. (2018). *Contaminación y remediación de suelos en Colombia. Aplicación a la minería de oro*. Ediciones EAN.
- Menéndez, J., & Muñoz, S. (2021). Water and soil contamination from mining tailings. *Paideia XXI*, 11(1), 141-154. <https://doi.org/10.31381/paideia.v11i1.3622>
- Meslier, V., Quinquis, B., Da Silva, K., Plaza Oñate, F., Pons, N., Roume, H., Podar, M., & Almeida, M. (2022). Benchmarking second and third-generation sequencing platforms for microbial metagenomics. *Scientific Data*, 9, 694. <https://doi.org/10.1038/s41597-022-01762-z>
- Ministerio de Energía y Minas. (2024). *Anuario Minero 2023*. <https://www.gob.pe/institucion/minem/informes-publicaciones/5804716-anuario-minero-2023>
- Moreno, L. G. N., Vázquez, L., Cordero, A. R., & González, J. M. (2022). Contaminación y hongos: Resistencia a metales pesados. *Latam: revista latinoamericana de Ciencias Sociales y Humanidades*, 3(2), 16.
- Moreno-Aguirre, S. B., Vértiz-Osores, J. J., Paredes-Espinal, C. E., Meseth, E., Vílchez-Ochoa, G. L., Espino-Ciudad, J. A., & Del Pino, L. F. (2024). Ecological risk of metals

- in Andean water resources: A framework for early environmental assessment of mining projects in Peru. *Heliyon*, 10(9), e30739. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e30739>
- Murphy, S. C., Martin, N. H., Barbano, D. M., & Wiedmann, M. (2016). Influence of raw milk quality on processed dairy products: How do raw milk quality test results relate to product quality and yield? *Journal of Dairy Science*, 99(12), 10128-10149. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11172>
- Navas, M., Pérez-Esteban, J., Torres, M., Hontoria, C., & Moliner, A. (2021). Taxonomic and functional analysis of soil microbial communities in a mining site across a metal(loid) contamination gradient. *European Journal of Soil Science*, 72(3), 1190-1205. <https://doi.org/10.1111/ejss.12979>
- Nies, D. H. (1999). Microbial heavy-metal resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(6), 730-750. <https://doi.org/10.1007/s002530051457>
- Novoa, H. H. V., Arizaca, A. Á., & Huisa, F. M. (2022). Efectos en los ecosistemas por presencia de metales pesados en la actividad minera de pequeña escala en Puno. *Revista de Investigaciones Altoandinas - Journal of High Andean Research*, 24(3), 182-189. <https://doi.org/10.18271/ria.2022.361>
- Olsen, G. J., & Woese, C. R. (1993). Ribosomal RNA: A key to phylogeny. *The FASEB Journal*, 7, 113-123. <https://doi.org/10.1096/fasebj.7.1.8422957>
- Orfao, A., & Morent, M. M. (2011). *Protocolo de Extracción de Ácidos Nucleicos*. Red Nacional de Biobancos - ISCIII. <https://redbiobancos.es/wp-content/uploads/pnt-extraccion-acidos-nucleicos.pdf>
- Organización Mundial de la Salud. (2017). *Riesgos para la salud relacionados con el trabajo y el medioambiente asociados a la extracción de oro artesanal o a pequeña escala*. Organización Mundial de la Salud. <https://iris.who.int/handle/10665/259452>

- Ortínez, O. B., Ize, I., & Gavilán, A. (2003). La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México. *Gaceta Ecológica*, 69, 83-92.
- Oudjehani, K., Zagury, G., & Deschênes, L. (2002). Natural attenuation potential of cyanide via microbial activity in mine tailings. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(3), 409-415. <https://doi.org/10.1007/s00253-001-0887-2>
- Pavithra, K. G., SundarRajan, P., Kumar, P. S., & Rangasamy, G. (2023). Mercury sources, contaminations, mercury cycle, detection and treatment techniques: A review. *Chemosphere*, 312, 137314. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137314>
- Paz-Barzola, D., Escobar-Segovia, K., Salgado-Almeida, B., Goyburo-Chavez, C., & Moreno-Chavez, J. (2023). Mercury and human health: Probabilistic risk characterization in one of the oldest gold mining areas in Ecuador. *Dyna*, 90(227), 110-116. <https://doi.org/10.15446/dyna.v90n227.107797>
- Piaggio, M. V. (2007). Modelado de la electroforesis capilar por zona. *Aplicaciones bioquímicas y biotecnológicas*. <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/handle/11185/78>
- Pierce, B. A. (2009). *Genética: Un enfoque conceptual* (3<sup>a</sup> ed.). Editorial Médica Panamericana.
- Porres, G. P. (2020). *Papel del ribosoma bacteriano en la respuesta al estrés. Análisis proteómico de los efectos de la mutación 926 del ARNr 16S* [Universidad Da Coruña]. [https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/27143/PorresPerez\\_Gonzalo\\_TFM\\_2020.pdf](https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/27143/PorresPerez_Gonzalo_TFM_2020.pdf)
- Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. (2015). *Developing a national action plan to reduce, and where feasible, eliminate mercury use in artisanal and small scale gold mining: Working draf.*

[https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/11371/National\\_Action\\_Plan\\_draft\\_guidance\\_v12.pdf?sequence=1&isAllowed=](https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/11371/National_Action_Plan_draft_guidance_v12.pdf?sequence=1&isAllowed=)

Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. (2023). *Un punto final al rastro tóxico de la minería de oro a pequeña escala*. PNUMA. <https://www.unep.org/es/noticias-y-reportajes/reportajes/un-punto-final-al-rastro-toxico-de-la-mineria-de-oro-pequena>

Prosser, J. I., Bohannan, B. J. M., Curtis, T. P., Ellis, R. J., Firestone, M. K., Freckleton, R. P., Green, J. L., Green, L. E., Killham, K., Lennon, J. J., Osborn, A. M., Solan, M., Van Der Gast, C. J., & Young, J. P. W. (2007). The role of ecological theory in microbial ecology. *Nature Reviews Microbiology*, 5(5), 384-392. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1643>

Rajkumar, M., Ma, Y., & Freitas, H. (2013). Improvement of Ni phytostabilization by inoculation of Ni resistant *Bacillus megaterium* SR28C. *Journal of Environmental Management*, 128, 973-980. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.07.001>

Ramírez, S. I. J., & Cadena, S. (2023). Ecología microbiana: Desde el microscopio hasta el análisis genómico y bioinformático. *Inventio*, 18(46), 1-9. <https://doi.org/10.30973/inventio/2022.18.46/6>

Ramírez-Salcedo, J., Guzmán-León, S., & Chavez, L. (2014). En *Microarreglos de DNA: Fabricación Proceso y Análisis*. <https://www.researchgate.net/publication/296695965>

Reveco, R. P. (2025). Los nuevos desafíos de Chile en la gestión ambiental de los pasivos mineros. *Revista de Derecho Administrativo*, 41.

Reynoso, E., Dieser, S., & Moliva, M. (2022). *Manual de herramientas moleculares: Conceptos básicos y técnicas empleadas en el estudio de la genética microbiana* (Río Cuarto : Universidad Nacional de Río Cuarto).

- Rodicio, M., & Del Carmen Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 22(4), 238-245.
- Rodriguez, R. (2019). *Remoción de metales pesados presentes en el drenaje ácido de minería y su impacto ambiental en la comunidad de la cuenca procón* [PhD Thesis, Universidad Nacional del Callao].  
[http://repositorio.unac.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12952/4197/Rodriguez\\_Vilchez\\_IF\\_2019.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unac.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12952/4197/Rodriguez_Vilchez_IF_2019.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Rodríguez Rodríguez, G., Rodríguez Acono, M. Á., & Zarain Herzberg, Á. A. (2021). Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. *Mens. Bioquim*, 45, 11-22.
- Rohmah, D. N., & Retnaningrum, E. (2023). Assessment and bioremediation of mercury pollutants by highly mercury-resistant bacteria immobilized in biochar from small-scale artisanal gold mining areas. *Journal of Degraded and Mining Lands Management*, 10(2), Article 2. <https://doi.org/10.15243/jdmlm.2023.102.4061>
- Rojas, J. J. G., & Gárate, Z. O. (2011). Biorremediación de la contaminación por mercurio en minería informal. *Minería & medioambiente*, 31. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3767.7926>
- Sable, H., Singh, V., Kumar, V., Roy, A., Pandit, S., Kaur, K., Rustagi, S., & Malik, S. (2024). Toxicological and bioremediation profiling of nonessential heavy metals (mercury, chromium, cadmium, aluminium) and their impact on human health: A review. *Toxicologie Analytique et Clinique*, 36(3), 205-234. <https://doi.org/10.1016/j.toxac.2024.03.096>

- Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Coulson, A. R., Fiddes, J. C., Hutchison, C. A., Slocombe, P. M., & Smith, M. (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage  $\phi$ X174 DNA. *Nature*, 265(5596), 687-695. <https://doi.org/10.1038/265687a0>
- Sibanda, T., Selvarajan, R., Msagati, T., Venkatachalam, S., & Meddows-Taylor, S. (2019). Defunct gold mine tailings are natural reservoir for unique bacterial communities revealed by high-throughput sequencing analysis. *Science of The Total Environment*, 650, 2199-2209. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.380>
- Silver, S., & Phung, L. T. (2005). A bacterial view of the periodic table: Genes and proteins for toxic inorganic ions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 32, 587-605.
- Slatko, B. E., Kieleczawa, J., Ju, J., Gardner, A. F., Hendrickson, C. L., & Ausubel, F. M. (2011). "First Generation" Automated DNA Sequencing Technology. *Current Protocols in Molecular Biology*, 96(1). <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0702s96>
- Smith, N. M. (2019). "Our gold is dirty, but we want to improve": Challenges to addressing mercury use in artisanal and small-scale gold mining in Peru. *Journal of Cleaner Production*, 222, 646-654. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.03.076>
- Tchernitchin, A. N., & Herrero, L. (2006). Relaves mineros y sus efectos en salud, medio ambiente y desarrollo económico. Ejemplo de relave en el valle de Chacabuco-Polpaico. *Cuadernos médico sociales*, 46(1), 22-43.
- Telmer, K. H., & Veiga, M. M. (2009). Mercury fate and transport in the global atmosphere. En N. Pirrone & R. P. Mason (Eds.), *World emissions of mercury from artisanal and small scale gold mining*. Springer.
- Torres, F. J. R. (2021). *Técnicas y herramientas moleculares empleadas para la obtención de material genético* [Universidad Autónoma Metropolitana]. <https://repositorio.xoc.uam.mx/jspui/bitstream/123456789/26292/1/cbs1973836.pdf>

- Torsvik, V., & Øvreås, L. (2002). Microbial diversity and function in soil: From genes to ecosystems. *Current Opinion in Microbiology*, 5(3), 240-245. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(02\)00324-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(02)00324-7)
- Tozzo, P., D'Angiolella, G., Brun, P., Castagliuolo, I., Gino, S., & Caenazzo, L. (2020). Skin microbiome analysis for forensic human identification: What do we know so far? *Microorganisms*, 8, 873. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060873>
- Tsukuda, M., Kitahara, K., & Miyazaki, K. (2017). Comparative RNA function analysis reveals high functional similarity between distantly related bacterial 16 S rRNAs. *Scientific Reports*, 7, 9993. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10214-3>
- Valderrama, J. M. Martín, Ortigosa, F., & Cañas, R. A. (2020). Métodos de secuenciación de ácidos nucleicos: Primera generación. *Encuentros En La Biología*, 13(173), 19-25. <https://doi.org/10.24310/enbio.v13i173.17342>
- Valenzuela-González, F., Casillas-Hernández, R., Villalpando, E., & Vargas-Albores, F. (2015). The 16S rRNA gene in the study of marine microbial communities. *Ciencias Marinas*, 41(4), 297-313. <https://doi.org/10.7773/cm.v41i4.2492>
- Villena-Chávez, J. A. (2018). Calidad del agua y desarrollo sostenible. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 35(2), 304-308. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2018.352.3719>
- Villota-Calvachi, G., & Otero-Ramírez, I. (2009). Características culturales de bacterias cultivables. *Grupo de Biotecnología Microbiana, Universidad de Nariño*. <https://es.scribd.com/document/428345910/GUIA-LABORATORIO-DE-MICROBIOLOGIA>
- Vizueté-García, R. A., Pascual-Barrera, A. E., Taco-Taco, C. W., & Morales-Padilla, M. M. (2020). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos a base de bacterias

- utilizadas como bioproductos. *Revista Lasallista de Investigación*, 17(1), 177-187.  
<https://doi.org/10.22507/rli.v17n1a19>
- Vullo, D. L. (2003). Microorganismos y metales pesados: Una interacción en beneficio del medio ambiente. *Química viva*, 2(3), 93-104.
- Wang, C., Harbottle, D., Liu, Q., & Xu, Z. (2014). Current state of fine mineral tailings treatment: A critical review on theory and practice. *Minerals Engineering*, 58, 113-131.  
<https://doi.org/10.1016/j.mineng.2014.01.018>
- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, 51(2), 221-271.  
<https://doi.org/10.1128/mr.51.2.221-271.1987>
- Xu, W.-J., Meng, L., Zhao, Y.-K., Wu, J., Liu, H.-M., Wang, J.-Q., & Zheng, N. (2024). Characteristics of psychrophilic bacterial communities and associated metabolism pathways in different environments by a metagenomic analysis. *Science of The Total Environment*, 175496. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.175496>
- Yan, C., Wang, F., Liu, H., Liu, H., Pu, S., Lin, F., Geng, H., Ma, S., Zhang, Y., Tian, Z., Chen, H., Zhou, B., & Yuan, R. (2020). Deciphering the toxic effects of metals in gold mining area: Microbial community tolerance mechanism and change of antibiotic resistance genes. *Environmental Research*, 189, 109869.  
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109869>
- Yan, K., Wang, H., Lan, Z., Zhou, J., Fu, H., Wu, L., & Xu, J. (2022). Heavy metal pollution in the soil of contaminated sites in China: Research status and pollution assessment over the past two decades. *Journal of Cleaner Production*, 373, 133780.  
<https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.133780>
- Yang, B., Wang, Y., & Qian, P.-Y. (2016). Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics*, 17(135).  
<https://doi.org/10.1186/s12859-016-0992-y>

- Yang, M.-Q., Wang, Z.-J., Zhai, C.-B., & Chen, L.-Q. (2024). Research progress on the application of 16S rRNA gene sequencing and machine learning in forensic microbiome individual identification. *Frontiers in Microbiology*, *15*, 1360457. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1360457>
- Yao, H., Wang, H., Ji, J., Tan, A., Song, Y., & Chen, Z. (2023). Isolation and identification of mercury-tolerant bacteria LBA119 from molybdenum-lead mining soils and their removal of Hg<sup>2+</sup>. *Toxics*, *11*(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/toxics11030261>
- Zaynab, M., Al-Yahyai, R., Ameen, A., Sharif, Y., Ali, L., Fatima, M., Khan, K. A., & Li, S. (2022). Health and environmental effects of heavy metals. *Journal of King Saud University - Science*, *34*(1), 101653. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101653>

## **ANEXOS**

## Anexo 1. Reporte de resultados de laboratorio M1 código N° 7051-2024



LABORATORIO DE ENSAYO ACREDITADO POR EL  
ORGANISMO DE ACREDITACIÓN INACAL - DA  
CON REGISTRO N° LE-055



### INFORME DE ENSAYOS N° 7051 - 2024 PÁGINA 1 DE 2

**SOLICITANTE** : DINA ELIANA COILA PANCCA  
**DIRECCIÓN** : JR. DEUSTUS MZ.A LOT 20-JULIACA-PUNO  
**PRODUCTO DECLARADO** : AGUA RESIDUAL-PROCESO MINERO  
**DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO** : Líquido transparente con presencia de sedimentos.  
**CODIFICACIÓN / MARCA** : Agua residual - Proceso minero (descarga de molinos) / ARI - M1.  
**DATOS DECLARADOS POR EL CLIENTE** : 22/11/2024 13:48 Procedencia: N: 8382353, E: 451807 - Puno / S.A de Putina / Ananea / C.P Rinconada.  
**TAMAÑO DE MUESTRA RECIBIDA** : 01 muestra de 100 mL aprox. para análisis FQ.  
**PRESENTACIÓN, ESTADO Y CONDICIÓN** : En envase PE cerrado etiquetado. En contenedor isotérmico a una temperatura de 5.6°C.  
**CONDICIONES DE RECEPCIÓN DE LA MUESTRA** : Recibida en el Laboratorio (Envases Proporcionados)  
**CONTRAMUESTRA Y PERIODO DE CUSTODIA** : Ninguna (por ser muestra única)  
**FECHA PRODUCCIÓN** : No especificada  
**FECHA DE VENCIMIENTO** : No especificada  
**CONTRATO N°** : 2408-2024  
**FECHA DE RECEPCIÓN** : 25/11/2024

#### CONDICIONES DE USO DEL PRESENTE INFORME DE ENSAYOS:

- El presente Informe de Ensayos tan sólo es válido únicamente para la Muestra analizada / el Lote muestreado , según sea el caso.
- No deben inferirse a la Muestra analizada o al Lote muestreado otros parámetros que no estén consignados en el presente Informe de Ensayos.
- En caso de que el producto haya sido muestreado por el cliente (Muestra recibida en laboratorio), BHIOS LABORATORIOS no se responsabiliza si las condiciones de muestreo no fueron las adecuadas, los resultados se aplican a la muestra tal como se recibió.
- En caso de que el producto haya sido muestreado por BHIOS LABORATORIOS , la presentación, estado y condición del lote corresponden a las encontradas al momento del muestreo.
- Los datos declarados por el cliente son consignados a solicitud expresa del mismo cliente y no son necesariamente verificados por el Laboratorio, por lo que BHIOS LABORATORIOS no asume responsabilidad por el uso de los mismos.
- El Periodo de Custodia es dependiente del tipo de ensayo y de la disponibilidad de la Muestra.
- BHIOS LABORATORIOS no guarda contramuestras de productos perecibles o de productos cuyas características pudieran variar durante el almacenamiento.
- El presente Informe de Ensayos no es un certificado de conformidad, ni certificado del sistema de calidad del productor.
- Está terminantemente prohibida la reproducción parcial de este Informe de Ensayos sin el conocimiento y la autorización escrita de BHIOS LABORATORIOS.
- Cualquier modificación, borrón o enmienda, anula el presente Informe de Ensayos.

INFORME DE ENSAYOS N° 7051 - 2024  
PÁGINA 2 DE 2

Metales Totales por ICP-MS

LAB	DETERMINACIÓN	LD	LC	AGUA RESIDUAL-PROCESO MINERO Agua residual - Proceso minero (descarga de molinos) / ARI - M1.	UNIDADES
FQ	Ag (Plata)	0.00001	0.00006	<0.00001	mg/L
FQ	Al (Aluminio)	0.0003	0.01	0.1100	mg/L
FQ	As (Arsénico)	0.000003	0.00002	0.017272	mg/L
FQ	B (Boro)	0.0002	0.005	0.60000	mg/L
FQ	Ba (Bario)	0.00002	0.0004	<0.00002	mg/L
FQ	Be (Berilio)	0.000002	0.00002	<0.000002	mg/L
FQ	Bi (Bismuto)	0.000004	0.0002	<0.000004	mg/L
FQ	Ca (Calcio)	0.003	0.05	358.56	mg/L
FQ	Cd (Cadmio)	0.000001	0.00001	0.01770	mg/L
FQ	Ce (Cerio)	0.0000005	0.00002	<0.0000005	mg/L
FQ	Co (Cobalto)	0.000001	0.00001	<0.000001	mg/L
FQ	Cr (Cromo)	0.000003	0.00005	0.01740	mg/L
FQ	Cs (Cesio)	0.000001	0.00001	<0.000001	mg/L
FQ	Cu (Cobre)	0.00003	0.001	<0.00003	mg/L
FQ	Fe (Hierro)	0.0002	0.01	<0.0002	mg/L
FQ	Hg (Mercurio)	0.00002	0.00008	0.00229	mg/L
FQ	K (Potasio)	0.001	0.02	115.54000	mg/L
FQ	Li (Litio)	0.000004	0.0002	<0.000004	mg/L
FQ	Mg (Magnesio)	0.0004	0.02	0.03	mg/L
FQ	Mn (Manganeso)	0.00001	0.0002	<0.00001	mg/L
FQ	Mo (Molibdeno)	0.000003	0.0001	<0.000003	mg/L
FQ	Na (Sodio)	0.001	0.02	2180.00	mg/L
FQ	Ni (Niquel)	0.00001	0.0001	0.22980	mg/L
FQ	P (Fosforo)	0.001	0.02	<0.02	mg/L
FQ	Pb (Plomo)	0.00001	0.0002	<0.00001	mg/L
FQ	Sb (Antimonio)	0.000003	0.0001	<0.000003	mg/L
FQ	Se (Selenio)	0.00002	0.0002	<0.00002	mg/L
FQ	Si (Silicio)	0.008	0.1	3.300	mg/L
FQ	Sn (Estaño)	0.00001	0.0002	<0.00001	mg/L
FQ	Sr (Estroncio)	0.00001	0.0004	<0.00001	mg/L
FQ	Ti (Titanio)	0.00004	0.0002	<0.00004	mg/L
FQ	Tl (Talio)	0.000001	0.00002	<0.000001	mg/L
FQ	U (Uranio)	0.000001	0.00002	<0.000001	mg/L
FQ	V (Vanadio)	0.00001	0.0004	<0.00001	mg/L
FQ	Zn (Zinc)	0.0002	0.006	0.03000	mg/L

ABREVIATURAS:

mg/L : Miligramos por litro

MÉTODOS UTILIZADOS:

Metales Totales por ICP-MS EPA METHOD 6020 B, Rev. 2, July 2014 (VALIDADO - Modificado) (VALIDADO - Aplicado fuera del alcance) 2020 Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry

OBSERVACIONES:

Cualquier valor precedido por "<" indica menor al límite de cuantificación del método

LC: Límite de cuantificación del método.

LD: Límite de detección del método.

FECHAS DE EJECUCIÓN DE LOS ENSAYOS : FQ 25/11/2024 al 16/12/2024

FECHA DE EMISIÓN DEL PRESENTE INFORME DE ENSAYOS : 17/12/2024



Contraseña: NW2c1X



Firmado digitalmente por: Bgo. Miguel Valdivia Martínez  
Gerente Técnico - BHIOS LABORATORIOS S.R.L.  
mvaldivia@bhioslabs.com  
Av. Quiñones Mza. B Lote. 6  
20/12/2024 12:26

## Anexo 2. Reporte de resultados de laboratorio M2 código N° 7052-2024



LABORATORIO DE ENSAYO ACREDITADO POR EL  
ORGANISMO DE ACREDITACIÓN INACAL - DA  
CON REGISTRO N° LE-055



Registro N° LE-055

### INFORME DE ENSAYOS N° 7052- 2024 PÁGINA 1 DE 2

**SOLICITANTE** : DINA ELIANA COILA PANCCA  
**DIRECCIÓN** : JR. DEUSTUS MZ.A LOT 20-JULIACA-PUNO  
**PRODUCTO DECLARADO** : AGUA RESIDUAL-PROCESO MINERO  
**DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO** : Líquido transparente con presencia de sedimentos.  
**CODIFICACIÓN / MARCA** : Agua residual - Proceso minero (poza de relaves) / ARI - M2.  
**DATOS DECLARADOS POR EL CLIENTE** : 22/11/2024 13:47 Procedencia: N: 8382354, E: 451805 - Puno / S.A de Putina / Ananea / C.P Rinconada.  
**TAMAÑO DE MUESTRA RECIBIDA** : 01 muestra de 100 mL aprox. para análisis FQ.  
**PRESENTACIÓN, ESTADO Y CONDICIÓN** : En envase PE cerrado etiquetado. En contenedor isotérmico a una temperatura de 5.6°C.  
**CONDICIONES DE RECEPCIÓN DE LA MUESTRA** : Recibida en el Laboratorio (Envases Proporcionados)  
**CONTRAMUESTRA Y PERIODO DE CUSTODIA** : Ninguna (por ser muestra única)  
**FECHA PRODUCCIÓN** : No especificada  
**FECHA DE VENCIMIENTO** : No especificada  
**CONTRATO N°** : 2408-2024  
**FECHA DE RECEPCIÓN** : 25/11/2024

#### CONDICIONES DE USO DEL PRESENTE INFORME DE ENSAYOS:

- El presente Informe de Ensayos tan sólo es válido únicamente para la Muestra analizada / el Lote muestreado , según sea el caso.
- No deben inferirse a la Muestra analizada o al Lote muestreado otros parámetros que no estén consignados en el presente Informe de Ensayos.
- En caso de que el producto haya sido muestreado por el cliente (Muestra recibida en laboratorio), BHIOS LABORATORIOS no se responsabiliza si las condiciones de muestreo no fueron las adecuadas, los resultados se aplican a la muestra tal como se recibió.
- En caso de que el producto haya sido muestreado por BHIOS LABORATORIOS , la presentación, estado y condición del lote corresponden a las encontradas al momento del muestreo.
- Los datos declarados por el cliente son consignados a solicitud expresa del mismo cliente y no son necesariamente verificados por el Laboratorio, por lo que BHIOS LABORATORIOS no asume responsabilidad por el uso de los mismos.
- El Período de Custodia es dependiente del tipo de ensayo y de la disponibilidad de la Muestra.
- BHIOS LABORATORIOS no guarda contramuestras de productos perecibles o de productos cuyas características pudieran variar durante el almacenamiento.
- El presente Informe de Ensayos no es un certificado de conformidad, ni certificado del sistema de calidad del productor.
- Está terminantemente prohibida la reproducción parcial de este Informe de Ensayos sin el conocimiento y la autorización escrita de BHIOS LABORATORIOS.
- Cualquier modificación, borrón o enmienda, anula el presente Informe de Ensayos.

INFORME DE ENSAYOS N° 7052- 2024  
PÁGINA 2 DE 2

Metales Totales por ICP-MS

LAB	DETERMINACIÓN	LD	LC	AGUA RESIDUAL-PROCESO MINERO		UNIDADES
				Agua residual - Proceso minero (poza de relaves) /	ARI - M2.	
FQ	Ag (Plata)	0.00001	0.00006		<0.00001	mg/L
FQ	Al (Aluminio)	0.0003	0.01		0.81000	mg/L
FQ	As (Arsénico)	0.000003	0.00002		0.029061	mg/L
FQ	B (Boro)	0.0002	0.005		7.100	mg/L
FQ	Ba (Bario)	0.00002	0.0004		<0.00002	mg/L
FQ	Be (Berilio)	0.000002	0.00002		<0.000002	mg/L
FQ	Bi (Bismuto)	0.000004	0.0002		<0.000004	mg/L
FQ	Ca (Calcio)	0.003	0.05		712.66000	mg/L
FQ	Cd (Cadmio)	0.000001	0.00001		0.03330	mg/L
FQ	Ce (Cerio)	0.0000005	0.00002		<0.0000005	mg/L
FQ	Co (Cobalto)	0.000001	0.00001		<0.000001	mg/L
FQ	Cr (Cromo)	0.000003	0.00005		0.02320	mg/L
FQ	Cs (Cesio)	0.000001	0.00001		<0.000001	mg/L
FQ	Cu (Cobre)	0.00003	0.001		<0.00003	mg/L
FQ	Fe (Hierro)	0.0002	0.01		2.23	mg/L
FQ	Hg (Mercurio)	0.00002	0.00008		0.00724	mg/L
FQ	K (Potasio)	0.001	0.02		209.16	mg/L
FQ	Li (Litio)	0.000004	0.0002		<0.000004	mg/L
FQ	Mg (Magnesio)	0.0004	0.02		0.42	mg/L
FQ	Mn (Manganeso)	0.00001	0.0002		<0.00001	mg/L
FQ	Mo (Molibdeno)	0.000003	0.0001		<0.000003	mg/L
FQ	Na (Sodio)	0.001	0.02		4058.00	mg/L
FQ	Ni (Niquel)	0.00001	0.0001		0.25340	mg/L
FQ	P (Fosforo)	0.001	0.02		0.190	mg/L
FQ	Pb (Plomo)	0.00001	0.0002		<0.00001	mg/L
FQ	Sb (Antimonio)	0.000003	0.0001		<0.000003	mg/L
FQ	Se (Selenio)	0.00002	0.0002		<0.00002	mg/L
FQ	Si (Silicio)	0.008	0.1		3.500	mg/L
FQ	Sn (Estaño)	0.00001	0.0002		<0.00001	mg/L
FQ	Sr (Estroncio)	0.00001	0.0004		<0.00001	mg/L
FQ	Ti (Titanio)	0.00004	0.0002		<0.00004	mg/L
FQ	Tl (Talio)	0.000001	0.00002		<0.000001	mg/L
FQ	U (Uranio)	0.000001	0.00002		<0.000001	mg/L
FQ	V (Vanadio)	0.00001	0.0004		<0.00001	mg/L
FQ	Zn (Zinc)	0.0002	0.006		0.10300	mg/L

ABREVIATURAS:

mg/L : Miligramos por litro

MÉTODOS UTILIZADOS :

Metales Totales por ICP-MS

EPA METHOD 6020 B, Rev. 2, July 2014 (VALIDADO - Modificado) (VALIDADO - Aplicado fuera del alcance)  
2020 Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry

OBSERVACIONES :

Cualquier valor precedido por "<" indica menor al límite de cuantificación del método

LC: Límite de cuantificación del método.

LD: Límite de detección del método.

FECHAS DE EJECUCIÓN DE LOS ENSAYOS : FQ 25/11/2024 al 16/12/2024

FECHA DE EMISIÓN DEL PRESENTE INFORME DE ENSAYOS : 17/12/2024



Contraseña: Ds3POV



Firmado digitalmente por: Bigo, Miguel Valdivia Martinez  
Gerente Técnico - BHIOS LABORATORIOS S.R.L.  
mvaldivia@bhioslabs.com  
Av. Quilones Mza. B Lote. 6  
20/12/2024 12:26

### Anexo 3. Reporte de resultados de laboratorio M3 código N° 7053-2024



LABORATORIO DE ENSAYO ACREDITADO POR EL ORGANISMO DE ACREDITACIÓN INACAL - DA CON REGISTRO N° LE-055



## INFORME DE ENSAYOS N° 7053- 2024 PÁGINA 1 DE 2

**SOLICITANTE** : DINA ELIANA COILA PANCCA  
**DIRECCIÓN** : JR. DEUSTUS MZ.A LOT 20-JULIACA-PUNO  
**PRODUCTO DECLARADO** : AGUA RESIDUAL-PROCESO MINERO  
**DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO** : Líquido transparente con presencia de sedimentos.  
**CODIFICACIÓN / MARCA** : Agua residual - Proceso minero (afluente a laguna) / ARI - M3.  
**DATOS DECLARADOS POR EL CLIENTE** : 22/11/2024 13:52 Procedencia: N: 8382259, E: 451826 - Puno / S.A de Putina / Ananea / C.P Rinconada.  
**TAMAÑO DE MUESTRA RECIBIDA** : 01 muestra de 100 mL aprox. para análisis FQ.  
**PRESENTACIÓN, ESTADO Y CONDICIÓN** : En envase PE cerrado etiquetado. En contenedor isotérmico a una temperatura de 5.6°C.  
**CONDICIONES DE RECEPCIÓN DE LA MUESTRA** : Recibida en el Laboratorio (Envases Proporcionados)  
**CONTRAMUESTRA Y PERIODO DE CUSTODIA** : Ninguna (por ser muestra única)  
**FECHA PRODUCCIÓN** : No especificada  
**FECHA DE VENCIMIENTO** : No especificada  
**CONTRATO N°** : 2408-2024  
**FECHA DE RECEPCIÓN** : 25/11/2024

#### CONDICIONES DE USO DEL PRESENTE INFORME DE ENSAYOS:

- El presente Informe de Ensayos tan sólo es válido únicamente para la Muestra analizada / el Lote muestreado , según sea el caso.
- No deben inferirse a la Muestra analizada o al Lote muestreado otros parámetros que no estén consignados en el presente Informe de Ensayos.
- En caso de que el producto haya sido muestreado por el cliente (Muestra recibida en laboratorio), BHIOS LABORATORIOS no se responsabiliza si las condiciones de muestreo no fueron las adecuadas, los resultados se aplican a la muestra tal como se recibió.
- En caso de que el producto haya sido muestreado por BHIOS LABORATORIOS , la presentación, estado y condición del lote corresponden a las encontradas al momento del muestreo.
- Los datos declarados por el cliente son consignados a solicitud expresa del mismo cliente y no son necesariamente verificados por el Laboratorio, por lo que BHIOS LABORATORIOS no asume responsabilidad por el uso de los mismos.
- El Período de Custodia es dependiente del tipo de ensayo y de la disponibilidad de la Muestra.
- BHIOS LABORATORIOS no guarda contramuestras de productos perecibles o de productos cuyas características pudieran variar durante el almacenamiento.
- El presente Informe de Ensayos no es un certificado de conformidad, ni certificado del sistema de calidad del productor.
- Está terminantemente prohibida la reproducción parcial de este Informe de Ensayos sin el conocimiento y la autorización escrita de BHIOS LABORATORIOS.
- Cualquier modificación, borrón o enmienda, anula el presente Informe de Ensayos.

INFORME DE ENSAYOS N° 7053- 2024  
PÁGINA 2 DE 2

Metales Totales por ICP-MS

LAB	DETERMINACIÓN	LD	LC	AGUA RESIDUAL-PROCESO MINERO		UNIDADES
				Agua residual - Proceso minero (afluente a laguna) / ARI - M3.		
FQ	Ag (Plata)	0.00001	0.00006	<0.00001		mg/L
FQ	Al (Aluminio)	0.0003	0.01	<0.0003		mg/L
FQ	As (Arsénico)	0.000003	0.00002	0.023478		mg/L
FQ	B (Boro)	0.0002	0.005	1.9		mg/L
FQ	Ba (Bario)	0.00002	0.0004	<0.00002		mg/L
FQ	Be (Berilio)	0.000002	0.00002	<0.000002		mg/L
FQ	Bi (Bismuto)	0.000004	0.0002	<0.000004		mg/L
FQ	Ca (Calcio)	0.003	0.05	988.22		mg/L
FQ	Cd (Cadmio)	0.000001	0.00001	0.04430		mg/L
FQ	Ce (Cerio)	0.0000005	0.00002	<0.0000005		mg/L
FQ	Co (Cobalto)	0.000001	0.00001	<0.000001		mg/L
FQ	Cr (Cromo)	0.000003	0.00005	0.02780		mg/L
FQ	Cs (Cesio)	0.000001	0.00001	<0.000001		mg/L
FQ	Cu (Cobre)	0.00003	0.001	<0.00003		mg/L
FQ	Fe (Hierro)	0.0002	0.01	0.17		mg/L
FQ	Hg (Mercurio)	0.00002	0.00008	0.00446		mg/L
FQ	K (Potasio)	0.001	0.02	216.62000		mg/L
FQ	Li (Litio)	0.000004	0.0002	<0.000004		mg/L
FQ	Mg (Magnesio)	0.0004	0.02	<0.0004		mg/L
FQ	Mn (Manganeso)	0.00001	0.0002	<0.00001		mg/L
FQ	Mo (Molibdeno)	0.000003	0.0001	<0.000003		mg/L
FQ	Na (Sodio)	0.001	0.02	4737.60		mg/L
FQ	Ni (Niquel)	0.00001	0.0001	0.36160		mg/L
FQ	P (Fosforo)	0.001	0.02	0.040		mg/L
FQ	Pb (Plomo)	0.00001	0.0002	<0.00001		mg/L
FQ	Sb (Antimonio)	0.000003	0.0001	<0.000003		mg/L
FQ	Se (Selenio)	0.00002	0.0002	<0.00002		mg/L
FQ	Si (Silicio)	0.008	0.1	2.4		mg/L
FQ	Sn (Estaño)	0.00001	0.0002	<0.00001		mg/L
FQ	Sr (Estroncio)	0.00001	0.0004	<0.00001		mg/L
FQ	Ti (Titanio)	0.00004	0.0002	<0.00004		mg/L
FQ	Tl (Talio)	0.000001	0.00002	<0.000001		mg/L
FQ	U (Uranio)	0.000001	0.00002	<0.000001		mg/L
FQ	V (Vanadio)	0.00001	0.0004	<0.00001		mg/L
FQ	Zn (Zinc)	0.0002	0.006	0.05100		mg/L

ABREVIATURAS:

mg/L : Miligramos por litro

MÉTODOS UTILIZADOS:

Metales Totales por ICP-MS EPA METHOD 6020 B, Rev. 2, July 2014 (VALIDADO - Modificado) (VALIDADO - Aplicado fuera del alcance) 2020 Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry

OBSERVACIONES:

Cualquier valor precedido por "<" indica menor al límite de cuantificación del método

LC: Límite de cuantificación del método.

LD: Límite de detección del método.

FECHAS DE EJECUCIÓN DE LOS ENSAYOS : FQ 25/11/2024 al 16/12/2024

FECHA DE EMISIÓN DEL PRESENTE INFORME DE ENSAYOS : 17/12/2024



Contraseña: 11fRuo



Firmado digitalmente por: Bigo, Miguel Valdivia Martínez  
Gerente Técnico - BHIOS LABORATORIOS S.R.L.  
mvaldivia@bhioslabs.com  
Av. Quiñones Mza. B Lote. 6  
20/12/2024 12:26

## Anexo 4. Reporte de resultados de laboratorio S1 código N° 7054-2024



### INFORME DE ENSAYOS N° 7054- 2024 PÁGINA 1 DE 2

**SOLICITANTE** : DINA ELIANA COILA PANCCA  
**DIRECCIÓN** : JR. DEUSTUS MZ.A LOT 20-JULIACA-PUNO  
**PRODUCTO DECLARADO** : SEDIMENTOS-PROCESO MINERO  
**DESCRIPCIÓN DEL PRODUCTO** : Tierra húmeda de color negro.  
**CODIFICACIÓN / MARCA** : Sedimento Proceso minero / S - M1.  
**DATOS DECLARADOS POR EL CLIENTE** : 22/11/2024 14:10 Procedencia: N: 8382351, E: 451808 - Puno / S.A de Putina / Ananea / C.P Rinconada.  
**TAMAÑO DE MUESTRA RECIBIDA** : 01 muestra de 955 g aprox. para análisis FQ.  
**PRESENTACIÓN, ESTADO Y CONDICIÓN** : En bolsa de polietileno cerrada etiquetada. En contenedor isotérmico a una temperatura de 16.3°C.  
**CONDICIONES DE RECEPCIÓN DE LA MUESTRA** : Recibida en el Laboratorio (Envases Proporcionados)  
**CONTRAMUESTRA Y PERIODO DE CUSTODIA** : Ninguna (por ser muestra única)  
**FECHA PRODUCCIÓN** : No especificada  
**FECHA DE VENCIMIENTO** : No especificada  
**CONTRATO N°** : 2408-2024  
**FECHA DE RECEPCIÓN** : 25/11/2024

#### CONDICIONES DE USO DEL PRESENTE INFORME DE ENSAYOS:

- El presente Informe de Ensayos tan sólo es válido únicamente para la Muestra analizada / el Lote muestreado , según sea el caso.
- No deben inferirse a la Muestra analizada o al Lote muestreado otros parámetros que no estén consignados en el presente Informe de Ensayos.
- En caso de que el producto haya sido muestreado por el cliente (Muestra recibida en laboratorio), BHIOS LABORATORIOS no se responsabiliza si las condiciones de muestreo no fueron las adecuadas, los resultados se aplican a la muestra tal como se recibió.
- En caso de que el producto haya sido muestreado por BHIOS LABORATORIOS , la presentación, estado y condición del lote corresponden a las encontradas al momento del muestreo.
- Los datos declarados por el cliente son consignados a solicitud expresa del mismo cliente y no son necesariamente verificados por el Laboratorio, por lo que BHIOS LABORATORIOS no asume responsabilidad por el uso de los mismos.
- El Período de Custodia es dependiente del tipo de ensayo y de la disponibilidad de la Muestra.
- BHIOS LABORATORIOS no guarda contramuestras de productos perecibles o de productos cuyas características pudieran variar durante el almacenamiento.
- El presente Informe de Ensayos no es un certificado de conformidad, ni certificado del sistema de calidad del productor.
- Está terminantemente prohibida la reproducción parcial de este Informe de Ensayos sin el conocimiento y la autorización escrita de BHIOS LABORATORIOS.
- Cualquier modificación, borrón o enmienda, anula el presente Informe de Ensayos.

**INFORME DE ENSAYOS N° 7054- 2024**  
**PÁGINA 2 DE 2**

**Metales Totales por ICP-MS**

LAB	DETERMINACIÓN	LD	LC	SEDIMENTOS-PROCESO MINERO	UNIDADES
				Sedimento Proceso minero / S - M1.	
FQ	Ag (Plata)	0.0001	0.0006	<0.00001	mg/Kg
FQ	Al (Aluminio)	0.0030	0.1000	1969.96	mg/Kg
FQ	As (Arsénico)	0.0000	0.0002	194.580576	mg/Kg
FQ	B (Boro)	0.0017	0.0500	7.2152	mg/Kg
FQ	Ba (Bario)	0.0002	0.0040	<0.00002	mg/Kg
FQ	Be (Berilio)	0.0000	0.0002	<0.000002	mg/Kg
FQ	Bi (Bismuto)	0.0000	0.0020	<0.000004	mg/Kg
FQ	Ca (Calcio)	0.0305	0.5000	9810.18	mg/Kg
FQ	Cd (Cadmio)	0.0000	0.0001	0.69055	mg/Kg
FQ	Ce (Cerio)	0.0000	0.0002	<0.0000005	mg/Kg
FQ	Co (Cobalto)	0.0000	0.0001	<0.000001	mg/Kg
FQ	Cr (Cromo)	0.0000	0.0005	7.20587	mg/Kg
FQ	Cs (Cesio)	0.0000	0.0001	<0.000001	mg/Kg
FQ	Cu (Cobre)	0.0003	0.0100	13.342	mg/Kg
FQ	Fe (Hierro)	0.0018	0.1000	11898.62	mg/Kg
FQ	Hg (Mercurio)	0.0002	0.0008	330.1372	mg/Kg
FQ	K (Potasio)	0.0143	0.2000	222.22	mg/Kg
FQ	Li (Litio)	0.0000	0.0020	<0.000004	mg/Kg
FQ	Mg (Magnesio)	0.0038	0.2000	4.87	mg/Kg
FQ	Mn (Manganeso)	0.0001	0.0020	<0.00001	mg/Kg
FQ	Mo (Molibdeno)	0.0000	0.0010	<0.000003	mg/Kg
FQ	Na (Sodio)	0.0076	0.2000	2515.40	mg/Kg
FQ	Ni (Niquel)	0.0001	0.0010	14.3669	mg/Kg
FQ	P (Fosforo)	0.0079	0.2000	<0.0079	mg/Kg
FQ	Pb (Plomo)	0.0001	0.0020	152.59720	mg/Kg
FQ	Sb (Antimonio)	0.0000	0.0010	<0.000003	mg/Kg
FQ	Se (Selenio)	0.0002	0.0020	<0.00002	mg/Kg
FQ	Si (Silicio)	0.0754	1.0000	5.51	mg/Kg
FQ	Sr (Estroncio)	0.0001	0.0020	<0.00001	mg/Kg
FQ	Sr (Estroncio)	0.0001	0.0040	<0.00001	mg/Kg
FQ	Ti (Titanio)	0.0004	0.0020	<0.00004	mg/Kg
FQ	Tl (Talio)	0.0000	0.0002	<0.000001	mg/Kg
FQ	U (Uranio)	0.0000	0.0002	<0.000001	mg/Kg
FQ	V (Vanadio)	0.0001	0.0040	<0.00001	mg/Kg
FQ	Zn (Zinc)	0.0020	0.0600	86.28	mg/Kg

**ABREVIATURAS:**

mg/Kg : Miligramos por kilogramo

**MÉTODOS UTILIZADOS :**

Metales Totales por ICP-MS : Digestion + EPA METHOD 6020 B, Rev. 2 2014 Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry

**OBSERVACIONES :**

Cualquier valor precedido por "<" indica menor al límite de cuantificación del método

LC: Límite de cuantificación del método.

LD: Límite de detección del método.

**FECHAS DE EJECUCIÓN DE LOS ENSAYOS :** FQ 25/11/2024 al 16/12/2024

**FECHA DE EMISIÓN DEL PRESENTE INFORME DE ENSAYOS :** 17/12/2024



Contraseña: IDShZM



Firmado digitalmente por: Bigo, Miguel Valdivia Martínez  
Gerente Técnico - BHIOS LABORATORIOS S.R.L.  
mvaldivia@bhioslabs.com  
Av. Quíñones Mza. B Lote. 6  
19/12/2024 18:03

**Anexo 5.** Resultados del proceso de secuenciación M1, M2 y S1

>P1\_27F cepa M1

GCAGTCGAGCGGATTGATGGGAGCTTGCTCCCTGATATCAGCGGCGGACGG  
GTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAA  
CCGGGGCTAATACCGGATAACTCATTTCCTCGCATGAGGAAATGTTGAAAG  
ATGGCTTCTTGCTATCACTTACAGATGGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGG  
TGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTG  
ATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGC  
AGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGT  
GAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAG  
TGCCGTTTGAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGG  
CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCG  
GAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAA  
AGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACCTGAGTGC  
AGAAGAGGAAAGTGGAATTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTT  
GGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACTGACACTGAG  
GCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCACGC  
CGTanaCGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAG  
CTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACtgaaactcaaagg  
AATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT

>P3\_27F cepa M2

GCAGTCGAACGATGAAGCCCAGCTTGCTGGGTGGATTAGTGGCGAACGGGT  
GAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTTGACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACT  
GGGTCTAATACCGGATAGGAACGTCCACCGCATGGTGGTTGTTGGAAAGAT  
TTATCGGTCATGGATGGACTCGCGGCCTATCAGCTTGTTGGTGAGGTAATG  
GCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACA  
CTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT  
ATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGAC  
GGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGTAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGT  
ACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC  
GTAGGGTGCAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCG

GTTTGTTCGCGTCTGTTCGTGAAAGTCCGGGGCTTAACCCCGGATCTGCGGTG  
GGTACGGGCAGACTAGAGTGCAGTAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAG  
CGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGGTCT  
CTGGGCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCATGGGGAGCGAACAGGAT  
TAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGAC  
CATTCCACGGTTTCCGCGCCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCCCGCCTGGGG  
AGTACGGCCGCAAGGCTAAAACtcaaaggAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCG  
GCGGagcATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAagaACCTTACCAAGGCTTGA  
CATGTTCTcgaTcGCC

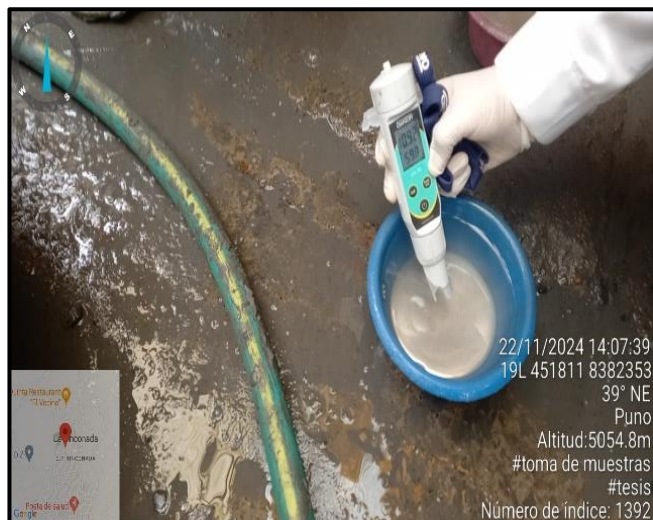
>P2\_27F cepa S1

GCAGTCGAGCGACAGACGAGGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACG  
GGTGAGTAACACGTGGGTAACCTACCTATAAGACTGGGATAACTTCGGGAA  
ACCGGAGCTAATACCGGATAATATTTCGAACCGCATGGTTCGATAGTGAAA  
GATGGCTCTGCTATCACTTATAGATGGACCTGCGCCGTATTAGCTAGTTGGT  
AAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTGA  
TCGGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA  
GTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTG  
AGTGATGAAGGTCTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTATTAGGGAAGAACAAC  
GTGTAAGTAACTGTGCACGTCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCT  
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGA  
ATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAG  
CCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGAAAACCTTGAGTGCAG  
AAGAGGAAAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGG  
AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGT  
GCGAAAGCGTGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGT  
anaCGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTA  
ACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTtgaactcaaaggAAT  
TGACGGGGACCCGCACaaGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT

## Anexo 6. Panel fotográfico

**Figura 21**

*Medición de pH en muestras de agua*



*Nota.* Toma de parámetros en muestra de agua con mercurio. Fuente: elaboración propia.

**Figura 22**

*Cadena de custodia*



*Nota.* Registro de los puntos de muestreo en la cadena de custodia. Fuente: elaboración propia.

**Figura 23**

*Toma de muestras para análisis*



*Nota.* Toma de parámetros fisicoquímicos en muestras de agua que contenían mercurio. Fuente: elaboración propia.

**Figura 24**

*Recolección de muestra*



*Nota.* Toma de muestra de agua en zona de poza de relaves. Fuente: elaboración propia.

**Figura 25**

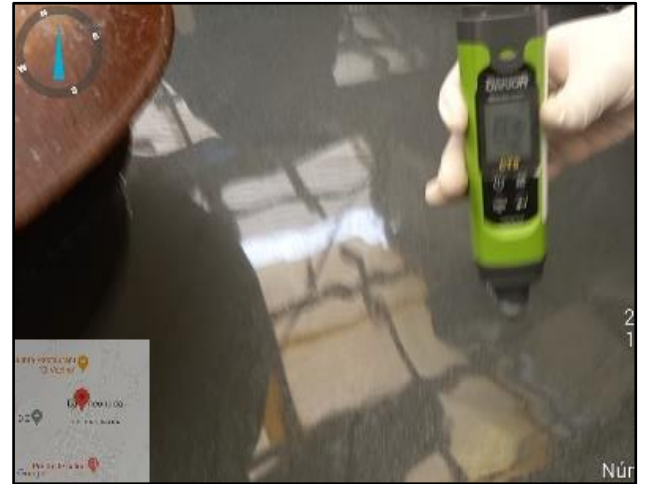
*Muestra de sedimentos*



*Nota.* La recolección de muestras de sedimentos se realizó en los depósitos de relaves mineros. Fuente: elaboración propia.

**Figura 26**

*Medición de turbidez*



*Nota.* Se midieron los parámetros fisicoquímicos en muestras de agua recolectadas de una poza de relave. Fuente: elaboración propia.

**Figura 27**

*Preparación de Agar Cerebro - Corazón*



*Nota.* La preparación de los medios de cultivo selectivos se realizó siguiendo las especificaciones. Fuente: elaboración propia.

**Figura 28**

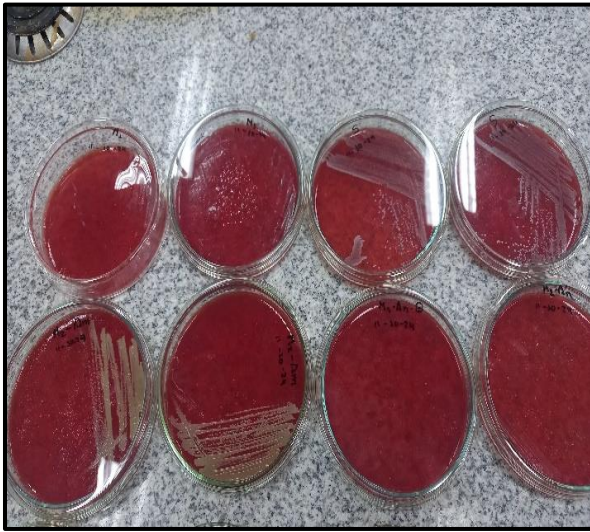
*Preparación de Agar Nutritivo*



*Nota.* Los microorganismos se cultivaron en medios preparados en el laboratorio según el protocolo establecido. Fuente: elaboración propia.

**Figura 29**

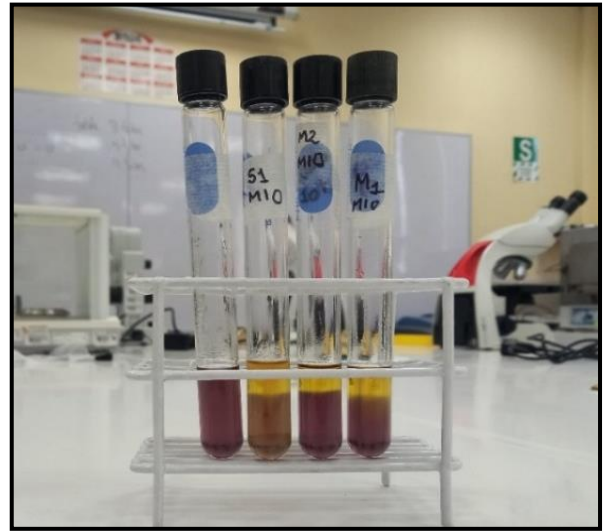
*Medio de cultivo Agar Sangre*



*Nota.* Crecimiento de microorganismos en placas Petri con medio agar sangre. Fuente: elaboración propia.

**Figura 30**

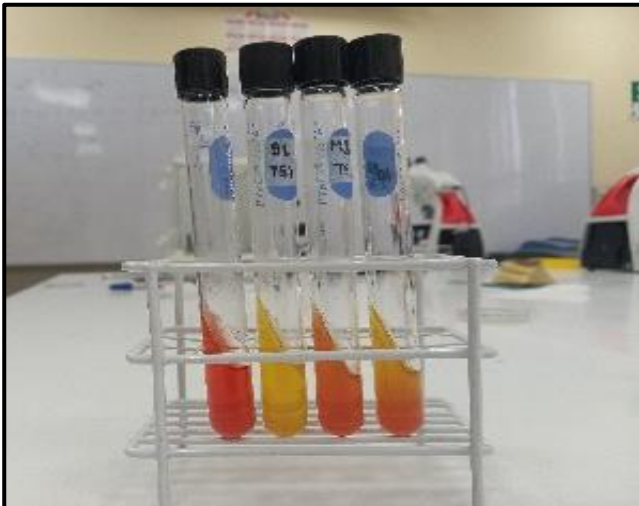
*Prueba Bioquímica Oxidasa*



*Nota.* Las muestras (M1, M2, S1) y el blanco fueron tratados con el reactivo de Kovacs y luego dispuestos en una gradilla. Fuente: elaboración propia.

**Figura 31**

*Pruebas bioquímicas TSI*



*Nota.* Las muestras, identificadas como M1, M2 y S1, junto con un blanco de control, fueron colocadas en una gradilla; todas ellas fueron preparadas en el laboratorio de microbiología. Fuente: elaboración propia.

**Figura 32**

*Distribución de pruebas bioquímicas*



*Nota.* El medio de cultivo se distribuyó de manera uniforme en cada tubo de ensayo. Fuente: elaboración propia.