UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

Caracterización molecular de microorganismos nativos formadores de biofilm para la colonización de tajos mineros de la región de Cajamarca

TESIS

Para optar el grado académico de Maestra en Ciencias con mención en Biotecnología Molecular

AUTOR

Bach. Priscila Nair Heredia Reto

Tumbes, 2025

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE ESCUELA DE POSGRADO MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

Caracterización molecular de microorganismos nativos formadores de biofilm para la colonización de tajos mineros de la región de Cajamarca

Tesis aprobado en forma y estilo por:

Mg. Víctor Santos Guzmán Tripul	Presidente	----------
Dra. Rosa Liliana Solis Castro	Secretaria	---------- Dra. Rosa Liliana Solis Castro Orcid 0000-0002-1813-8644
Mg. José Antonio Silva Chavez	Vocal	----------

TUMBES, 2025

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE ESCUELA DE POSGRADO MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

Caracterización molecular de microorganismos nativos formadores de biofilm para la colonización de tajos mineros de la región de Cajamarca

Los suscritos declaramos que la tesis tesis es original en su contenido y forma:

Blga. Priscila Nair Heredia Reto	Autor	
Ph. D. Benoit Mathieu Diringer	Asesor	
Mg. Rosita T. Castillo Rogel	Coasesor	

TUMBES, 2025

Acta de sustentación

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
Licenciada
Resolución del Consejo Directivo N° 155-2019-SUNEDU/CD
ESCUELA DE POSGRADO
Tumbes – Perú

"Año de la recuperación y consolidación de la economía peruana"

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En Tumbes, a los 25 días de setiembre del dos mil veinticinco, siendo las 20 horas y 00 minutos, se reunieron mediante la modalidad virtual (https://teams.microsoft.com/l/meetup-join/19%3ameeting_ZTA5YmFkZjUtNzRlOC00MmM4LWI1YzYtODYyNDMwNjZjMTYx%40thread.v2/0?context=%7b%22Tid%22%3a%22149bf9fd-f38a-4b75-90c1-1c43013ccd65%22%2c%22Oid%22%3a%227bc4259e-0c9f-4918-8043-cba68609d990%22%7), los miembros del jurado calificador constituido con la Resolución N° 0397-2022 /UNTUMBES-EPG-D, del dieciséis de setiembre del dos mil veintidós, presidido por el Mg Victor Santos Guzman Tripul, e integrado por la Dra. Rosa Liliana Solis Castro (secretaria), Mg. José Antonio Silva Chávez (vocal) además del Dr. Benoit Mathieu Diringer (asesor).

Instalado el jurado, se procedió a la evaluación, deliberación y calificación del acto de la sustentación de la tesis titulada: "Caracterización molecular de microorganismos nativos formadores de biofilm para la colonización de tajos mineros de la región de Cajamarca" presentada por la egresada **Bach. Priscila Nair Heredia Reto** para optar el grado académico de **MAESTRA EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR**.

Concluida la sustentación y absueltas las preguntas, por parte del (la) sustentante y después de la correspondiente, deliberación el jurado, conforme a lo normado en el artículo N° 111 del Reglamento de Tesis de la Universidad Nacional de Tumbes, declara al sustentante **APROBADO**, por unanimidad con el calificativo de **MUY BUENO.**

Por lo anterior, el sustentante está expedito para iniciar los trámites correspondientes y conducentes a la obtención del grado académico de Maestra en Ciencias con mención en Biotecnología Molecular, en conformidad con lo normado en la Ley Universitaria N° 30220, el Texto Único Ordenado del Estatuto, El Reglamento General, el Reglamento General de Grados Títulos y el Reglamento de Tesis de la Universidad Nacional de Tumbes.

Siendo las 22 horas y 15 minutos, del mismo día, se dio por concluido la ceremonia académica, procediendo a firmar el acta en presencia de público asistente.

Tumbes, 25 de setiembre del 2025

Mg. Victor Santos Guzmán Tripul
Presidente
DNI: 18090530
Código ORCID:0000-0002-5304-0407

Dra. Rosa Liliana Solis Castro
Secretaria
DNI: 17628592
Código ORCID: 0000-0002-1813-8644

Mg. José Antonio Silva Chávez
Vocal
DNI: 41013171
Código ORCID: 0000-0001-5763-407X

Dr. Benoit Mathieu Diringer
Asesor
Carnet de extranjería 000727051
Código ORCID: 0000-0001-6129-1751

C.c.
Jurado de Tesis (03),
Asesor
Interesado
Coasesor (es)
Unidad de Investigación.
Archivo (Director EPG).

Informe de originalidad

Tesis_Priscila Heredia Reto (1).pdf

por Priscila Nair Heredia Reto

Fecha de entrega: 28-sept-2025 11:10p. m. (UTC-0500)
Identificador de la entrega: 2703301538
Nombre del archivo: Tesis_Priscila_Heredia_Reto_1_.pdf (3.19M)
Total de palabras: 30731
Total de caracteres: 175176



Benoit Mathieu DIRINGER - Asesor

ORCID: 0000-0001-6129-1751

Tesis_Priscila Heredia Reto (1).pdf

INFORME DE ORIGINALIDAD

6%	5%	2%	3%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE



Benoit Mathieu DIRINGER - Asesor

ORCID: 0000-0001-6129-1751

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.untumbes.edu.pe Fuente de Internet	1%
2	Submitted to Universidad Nacional de Tumbes Trabajo del estudiante	<1%
3	app.inti.gob.ar Fuente de Internet	<1%
4	myslide.es Fuente de Internet	<1%
5	Submitted to Universidad Estatal Amazonica- Trabajo del estudiante	<1%
6	Submitted to Liverpool John Moores University Trabajo del estudiante	<1%
7	Xiomara Moreno, Melanie Ventura, María Mercedes Panizo, María Fátima Garcés. "Evaluación de la formación de biopelículas en aislamientos bacterianos y fúngicos por el método semicuantitativo de microtitulación con cristal violeta y el cualitativo de agar con rojo Congo", Biomédica, 2022 Publicación	<1%
8	idus.us.es Fuente de Internet	<1%

9	Submitted to Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann Trabajo del estudiante	<1 %
10	assets-eu.researchsquare.com Fuente de Internet	<1 %
11	www.researchgate.net Fuente de Internet	<1 %
12	www.revistafronterabiotecnologica.cibatlaxcala.ipn.mx Fuente de Internet	<1 %
13	recursos.corpoica.org.co Fuente de Internet	<1 %
14	vdoc.pub Fuente de Internet	<1 %
15	dugi-doc.udg.edu Fuente de Internet	<1 %
16	dspace.ups.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
17	www.compostandociencia.com Fuente de Internet	<1 %
18	Jingjing Guo, Wulong Luo, Xiaowen Wu, Yong Li, Zimin Liu, Hui Fang, Qi Chen, Enchao Li, Yunkun Wang. "Stochastic and deterministic mechanisms jointly drive the assembly of microbial communities in cold-rolling wastewater across China", Journal of Hazardous Materials, 2025 Publicación	<1 %
19	es.scribd.com Fuente de Internet	<1 %
	bibliotekanauki.pl	

Benoit Mathieu DIRINGER - Asesor

ORCID: 0000-0001-6129-1751

20	Fuente de Internet	<1 %
21	dx.doi.org Fuente de Internet	<1 %
22	hdl.handle.net Fuente de Internet	<1 %
23	www.e-allscience.com Fuente de Internet	<1 %
24	repositoriodigital.uns.edu.ar Fuente de Internet	<1 %
25	buleria.unileon.es Fuente de Internet	<1 %
26	repositorio.puce.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
27	sci-platform.org Fuente de Internet	<1 %
28	Submitted to uniminuto Trabajo del estudiante	<1 %
29	vdocuments.es Fuente de Internet	<1 %
30	Patricia Martínez-Jaimes, Edgar Marínez Fernández, Dagoberto Guillén-Sánchez, Ramón Suárez-Rodríguez et al. "Necrosis de la raíz de la caña de azúcar (Saccharum officinarum) causada por Fusarium spp.", Acta Agrícola y Pecuaria, 2020 Publicación	<1 %
31	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	<1 %

Benoit Mathieu DIRINGER - Asse

ORCID: 0000-0001-6129-1751

32	Submitted to Universidad Cesar Vallejo Trabajo del estudiante	<1%
33	Submitted to Universidad San Francisco de Quito Trabajo del estudiante	<1%
34	Submitted to Universidad de la Amazonia Trabajo del estudiante	<1%
35	coggle.it Fuente de Internet	<1%
36	cybertesis.uni.edu.pe Fuente de Internet	<1%
37	docplayer.es Fuente de Internet	<1%
38	pubmed.ncbi.nlm.nih.gov Fuente de Internet	<1%
39	ri-ng.uaq.mx Fuente de Internet	<1%
40	www.ojs.suelos.org.ar Fuente de Internet	<1%
41	Submitted to Universidad Católica Santo Toribio de Mogrovejo Trabajo del estudiante	<1%
42	Zamorano Almonte, Vasty Constanza Nicol. "Aislamiento y caracterizacion de un nuevo microorganismo reductor de hierro exoelectrogenico", Pontificia Universidad Catolica de Chile (Chile), 2021 Publicación	<1%
43	sedici.unlp.edu.ar Fuente de Internet	<1%

Benoit Mathieu DIRINGER - Asesor

ORCID: 0000-0001-6129-1751

44	cicy.repositorioinstitucional.mx Fuente de Internet	<1%
45	dspace.pucesi.edu.ec Fuente de Internet	<1%
46	huru.unsj.edu.ar Fuente de Internet	<1%
47	scholar.ufs.ac.za Fuente de Internet	<1%

Excluir citas	Activo	Excluir coincidencias	< 15 words
Excluir bibliografía	Activo		

Benoit Mathieu DIRINGER - Asesor

ORCID: 0000-0001-6129-1751

DEDICATORIA

A Dios por todas las bendiciones que me otorga cada día. Y a mi familia, por su apoyo incondicional permanente.

AGRADECIMIENTO

Agradezco inmensamente a Dios, en lo profesional, por brindarme la oportunidad de estudiar esta maestría y en lo personal, por su gracia que me sostiene para seguir adelante con mi propósito.

A mis padres, que son mi fuente de inspiración y mi agradecimiento eterno por sus enseñanzas de vida que me guían.

Y para culminar, agradezco a todas las personas e instituciones que colaboraron para llevar a cabo la tesis, Incabiotec SAC, Compañía de minas Buenaventura SAA, Mina La Zanja SRL y Coimolache SA. También a la Universidad Nacional de Tumbes, a mi jurado y mis maestros, Eric, Virna, Benoit, Dicson y Rosita, a quienes recuerdo con cariño. Menciones especiales para Gabriela Palomino, Jean Louis Falen, Mauricio Zingg y a mi equipo de trabajo, sin su apoyo no habría sido posible la ejecución del presente proyecto.

ÍNDICE

Resumen XVI

Abstract XVII

I. Introducción 18

II. Revisión de la literatura 21

2.1. Conceptos teóricos 21

2.1.1. Minería 21

A. Mina de tajo abierto 21

B. Suelos mineros 22

C. Drenaje ácido de mina 23

2.1.2. Microbiología 23

A. Bacteria 23

B. Cianobacteria 24

C. Hongos 24

D. Microalgas 24

E. Biofilm 25

Fases de formación de *biofilm*s 25

i. Contacto inicial o adhesión: 25

ii. Maduración: 26

iii. Dispersión: 26

2.1.3. Biología Molecular 27

1) Definiciones 27

2) Técnicas 32

2.2. Antecedentes 35

III. Metodología 38

Actividad 1: Recolección de muestras del tajo y suelo de las operaciones mineras auríferas “Mineria La Zanja” (MLZ) y Coimolache S.A. (CMC) 38

Actividad 2: Caracterización metagenómica de las comunidades microbianas estudiadas 40

Actividad 3: Aislamiento selectivo y caracterización de microorganismos de interés 43

Actividad 4: Selección e identificación molecular de los microorganismos de interés 45

Actividad 5: Pruebas de antagonismo 46

Actividad 6: Formación de *biofilm* de bacterias y levaduras para la formulación de consorcios 47

Actividad 7: Masificación de microorganismos de los consorcios seleccionados para roca 48

Actividad 8: Ensayo de colonización de microorganismos formadores de *biofilm*s a pequeña escala en el laboratorio 50

Actividad 9: Sucesión ecológica 53

Actividad 10: Procesamiento y análisis de datos 56

IV. Resultados y discusión 57

4.1. Caracterización metagenómica de las comunidades microbianas estudiadas 57

Datos de secuenciación 57

Metagenómica de bacterias 58

Metagenómica de hongos 65

4.2. Aislamiento selectivo, identificación molecular y caracterización de microorganismos de interés 70

4.3. Pruebas de antagonismo 77

Pruebas de antagonismo entre los grupos 80

4.4. Formación de biopelículas de bacterias y levaduras para la formulación de consorcios 86

4.5. Masificación de microorganismos de los consorcios seleccionados para roca 88

Crecimiento óptimo de los microorganismos a diversas concentraciones de melaza 88

Curvas de crecimiento al 2.5 % de melaza de levaduras y bacterias 92

Curvas de crecimiento bacteriano a 20 °C y 30 °C 93

4.6. Ensayo de colonización de microorganismos formadores de biopelículas a pequeña escala en el laboratorio 94

Bioensayo de colonización de bacterias, hongos, cianobacterias/microalgas en rocas 94

Bioensayo de cianobacterias/microalgas en diferentes sustratos 97

Bioensayo de cianobacterias/microalgas en rocas de gran tamaño 99

4.7. Sucesión ecológica 100

Ensayo de crecimiento de hongos y microalgas en rocas 100

Ensayo sucesión de hongos, cianobacterias/microalgas y bacterias 108

V. Conclusiones 112

VI. Recomendaciones 113

VII. Referencias bibliográficas 114

VIII. Anexos 136

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 *Evaluación del pH en diferentes tratamientos de microalgas y hongos*….54
Tabla 2 *Tratamientos para impermeabilización y mejoramiento de pH*.....56
Tabla 3 *Número de secuencias crudas y filtradas utilizadas para el análisis metagenómico dirigido al gen ARNr 16S y al gen ARNr ITS*.....58
Tabla 4 *Número de OTU bacterianas en muestras de suelos y tajos*.....59
Tabla 5 *Número de OTU fúngicas en muestras de suelo y tajos*.....65
Tabla 6 *Bacterias y levaduras aislados en los medios selectivos*.....70
Tabla 7 *Hongos aislados en los medios selectivos* 72
Tabla 8 *Cianobacterias/microalgas aisladas en medio BG11*.....74
Tabla 9 *Prueba de compatibilidad entre bacterias* 78
Tabla 10 *Prueba de compatibilidad entre hongos* 79
Tabla 11 *Prueba de compatibilidad entre bacterias y hongos filamentosos*.....81
Tabla 12 *Prueba de compatibilidad entre consorcios bacterianos y cianobacterias y/o microalgas*.....82
Tabla 13 *Prueba de compatibilidad entre hongos y cianobacterias/microalgas*....85
Tabla 14 *Curvas de Crecimiento Bacteriano en Medio LB a 20 °C y 30 °C* 94
Tabla 15 *pH promedio del agua de las rocas* 95
Tabla 16 *Medida del pH del lavado de rocas con inóculos masificados en melaza* 96
Tabla 17 *Crecimiento de cepas de microalgas y hongos*.....101
Tabla 18 *Tratamientos propuestos de sucesión de los microorganismos*.....109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 *Terminología de una explotación a tajo abierto* 21
Figura 2 *Ciclo de vida del biofilm* 26
Figura 3 *Estructura del ribosoma en procariota* 29
Figura 4 *Genes ribosomales y sus espacios interunidades, espacios intergénicos y dominios de la subunidad grande* 30
Figura 5 *Protocolo de amplificación por PCR*.....34
Figura 6 *Ubicación geográfica de los puntos de muestreo en las operaciones mineras La Zanja y Coimolache* 39
Figura 7 *Electroforesis*.....42
Figura 8 *Proceso de diluciones seriales a partir de las placas madres de cianobacterias y/o microalgas*.....49
Figura 9 *Masificación de cianobacterias y/o microalgas a 100 ml*.....50
Figura 10 *Cepas seleccionadas para el bioensayo*.....51
Figura 11 *Superficies utilizadas para el bioensayo* 52
Figura 12 *Rocas de mayor tamaño utilizadas en el bioensayo* 53
Figura 13 *Pasos de medición del pH* 54
Figura 14 *Abundancia relativa de filos bacterianos. A. Suelos. B. Tajos* 61
Figura 15 *Abundancia relativa de géneros bacterianos. A. Suelos. B. Tajos* 64
Figura 16 *Abundancia relativa de filos fúngicos. A. Suelos. B. Tajos*.....67
Figura 17 *Abundancia relativa de géneros fúngicos. A. Suelos. B. Tajos*.....69
Figura 18 *Cianobacterias/microalgas presentes en cada muestra*.....77
Figura 19 *A. Ensayo de producción de biofilm. B. Acinetobacter septicus (OA3): Control Positivo. C. Acinetobacter septicus (OA2). D. Pandoraea terrigena (UA3). E. Serratia sp. (OP1). F. Serratia quinivorans (L4)* 87
Figura 20 *Crecimiento de bacterias a diversas concentraciones de melaza* 89
Figura 21 *Crecimiento hongos filamentosos a diversas concentraciones de melaza* 91
Figura 22 *Crecimiento de Candida tropicalis (L1) a diversas concentraciones de melaza* 92
Figura 23 *Crecimiento de la bacteria Serratia quinivorans (L4) al 2.5 % de melaza* 93
Figura 24 *Crecimiento de levadura Candida tropicalis (L1) al 2.5 % de melaza*...93

Figura 25 *pH promedio del lavado de rocas*.....97
Figura 26 *Colonización de superficie semilisa* 98
Figura 27 *Presencia de Pseudococcomyxa (cepa 3) en loseta*.....98
Figura 28 *Colonización de la microalga Pseudococcomyxa (cepa 3) en roca*....100
Figura 29 *Crecimiento de hongos filamentosos y Pseudococcomyxa (cepa 3)*..102
Figura 30 *Crecimiento de los hongos filamentosos y Characium (cepa 4)* 102
Figura 31 *Crecimiento de los hongos filamentosos y Fallacia, Fistulifera y Pseudococcomyxa (cepa 11)* 103
Figura 32 *Crecimiento del Pseudeurotium zonatum (H9) sobre las rocas con Pseudococcomyxa (microalga 3)*.....104
Figura 33 *Crecimiento de Penicillium scabrosum (H1), Penicillium nothofagi (H6) y Neurospora crassa (H8) con Pseudococcomyxa (microalga 3), y del hongo 1 con la microalga 11* 104
Figura 34 *Medición de pH entre Pseudococcomyxa (microalga 3) y: A. Penicillium scabrosum (Hongo 1). B. Pseudeurotium bakeri (Hongo 5). C. Neurospora crassa (Hongo 8). D. Pseudeurotium zonatum (Hongo 9)*.....105
Figura 35 *Medición de pH entre la microalga 11 (Fallacia, Fistulifera y Pseudococcomyxa) y: A. Talaromyces francoae (Hongo 2). B. Trichoderma viridescens (Hongo 3). C. Pseudeurotium bakeri (Hongo 5). D. Penicillium pulvillorum (Hongo 7). E. Neurospora crassa (Hongo 8)*.....106
Figura 36 *Tratamientos propuestos de sucesión de los microorganismos* 111
Figura 37 *Tratamientos individuales o grupales propuestos*.....111

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 *Información de puntos de muestreo*.....136
Anexo 2 *Número inicial de esporas de hongos utilizadas para el ensayo* 138
Anexo 3 *Tabla de Evaluación del Aspecto Superficial*.....138
Anexo 4 *Protocolo de extracción* 138
Anexo 5 *Imágenes de trabajo* 140

Resumen

Las operaciones de cierre de minas buscan restaurar los ecosistemas alterados a condiciones similares a las originales. Los microorganismos desempeñan un papel fundamental en el equilibrio del suelo y son esenciales para los procesos de restauración ecológica. Por ello, se caracterizaron microorganismos que mediante un enfoque metagenómico se analizó la estructura y composición bacteriana y fúngica en distintos tipos de suelos de una mina de oro a cielo abierto en Cajamarca: suelos prístinos, suelos superficiales almacenados (topsoils) suelos enriquecidos (tecnosuelos), tecnosuelos revegetados y tajos visualmente diferenciados. El análisis filogenético reveló un predominio en la comunidad bacteriana de los filos Proteobacteria y Acidobacteria en todas las muestras del suelo, mientras que los hongos Ascomycota predominó en suelos prístinos y topsoils, y Basidiomycota en los tecnosuelos. La composición microbiana a nivel de género varió entre los tipos de suelo, lo que sugiere una influencia de las enmiendas y la revegetación. En los tajos, referente a las bacterias de las muestras del suelo se observó un predominio de Proteobacteria y en combinaciones variables de hongos Ascomycota/Basidiomycota para cada muestra. Además, se aislaron e identificaron catorce bacterias, una levadura, nueve hongos filamentosos y quince cepas de cianobacterias/microalgas, a partir de los cuales se seleccionaron posibles consorcios microbianos nativos, capaces de generar *biofilm*s y mejorar el pH de rocas extraídas de tajos mineros bajo condiciones controladas. Estos resultados fueron validados mediante ensayos in vitro, que confirmaron que los microorganismos seleccionados forman *biofilm* tanto de manera individual como en consorcio. Lo que exhibió un comportamiento sinérgico que favorece la formación de estructuras multicelulares más resistentes. Estos hallazgos evidencian un alto potencial de aplicación de este consorcio microbiano como herramienta en procesos de biorremediación asociados a la industria minera.

Palabras clave: Bacterias, hongos, cianobacterias/microalgas, secuenciación de próxima generación, mina de oro, biopelícula.

Abstract

Mine closure operations aim to restore altered ecosystems to pristine conditions. Microorganisms play a fundamental role in soil balance and are essential for ecological restoration processes. Therefore, microorganisms were characterized and, using a metagenomic approach, their bacterial and fungal structure and composition were analyzed in different soil types at an open-pit gold mine in Cajamarca: pristine soils, stockpiled surface soils (topsoils), enriched soils (technosols), revegetated technosols, and visually differentiated pits. Phylogenetic analysis revealed a predominance of the Proteobacteria and Acidobacteria phyla in the bacterial community in all soil samples, while Ascomycota fungi predominated in pristine soils and topsoils, and Basidiomycota in the technosols. Microbial composition at the genus level varied among soil types, suggesting an influence of soil amendments and revegetation. In the pits, regarding the bacteria in the soil samples, a predominance of Proteobacteria was observed, along with varying combinations of Ascomycota/Basidiomycota fungi for each sample. Additionally, fourteen bacteria, one yeast, nine filamentous fungi, and fifteen strains of cyanobacteria/microalgae were isolated and identified. From these, potential native microbial consortia capable of generating biofilms and improving the pH of rocks extracted from mining pits under controlled conditions were selected. These results were validated through in vitro assays, which confirmed that the selected microorganisms form biofilms both individually and in consortia. This exhibited synergistic behavior that favors the formation of more resistant multicellular structures. These findings demonstrate the high potential for application of this microbial consortium as a tool in bioremediation processes associated with the mining industry.

Keywords: Bacteria, fungi, cyanobacteria/microalgae, next-generation sequencing, gold mine, biofilm.

I. Introducción

La industria minera es una de las actividades extractivas más controversiales a nivel mundial. En efecto, los procesos de extracción de los minerales preciosos generan una gran diversidad de contaminantes al ecosistema (Hou *et al.,* 2023). La exposición de minerales sulfurosos a la intemperie provoca la liberación masiva del azufre, su oxidación por los procesos microbianos y el contacto con el agua, formándose así el drenaje ácido de mina (DAM), el cual se caracteriza por su extrema acidez y alta concentración de metales pesados disueltos. Cuando la infiltración del DAM alcanza los cuerpos acuíferos, incluso de aguas subterráneas, el suelo, flora y fauna son perturbados y los recursos hídricos se tornan inadecuados para fines del consumo humano, agrícolas o industriales (Belley *et al.,* 2022).

La minería peruana está actualmente en su apogeo tornándose en el sector más relevante de la economía nacional. Frente a este gran dilema económico-ambiental, la minería tiene el compromiso de adoptar o implementar nuevas tecnologías que se alinean con las normativas ambientales cada vez más exigentes. Por ello, el sector debe posicionarse como un aliado de la preservación ambiental, que les permita seguir siendo altamente competitivos en el mercado y mantener un entorno estable y propicio (Oroza & Larrea, 2019; Rincón & Manzanares, 2020).

No obstante, la correcta gestión del cierre de las minas es un desafío particularmente importante de los países mineros para no generar pasivos ambientales que amenazan el desarrollo sostenible de sus sociedades. En el Perú, se rige por un programa técnico-financiero denominado “plan de cierre de mina”, el cual debe aprobarse antes de iniciar las operaciones. Este documento

describe la línea base ambiental del sitio, define las soluciones técnicas para restituir las condiciones originales una vez concluida la explotación y establece los mecanismos financieros que aseguran la ejecución del cierre. Su propósito es garantizar que el titular de la operación minera cumpla con las obligaciones y los compromisos asumidos y aplique las medidas necesarias para lograr un cierre más eficiente (Rodríguez & Julca, 2020; Acuña, 2023).

Frente a esta problemática, surge la necesidad del sector de impulsar diversas investigaciones sobre métodos de mitigación y prevención del DAM, cuyos resultados fueron la base para el desarrollo de tecnologías aplicadas al control y prevención del mismo, incluyendo procesos químicos, físicos y biológicos (Oroza & Larrea, 2019). El uso de biotecnologías de biorremediación microbiológica es el que genera menor impacto negativo en el ambiente y no requieren de sustancias artificiales (Vargas-Sacha *et al.,* 2021).

Los mecanismos de control de DAM y liberación de metales tóxicos podrían ser: (1) bacterias libres que forman partículas suspendidas móviles con una capacidad de absorción de metales mayor que la del medio, (2) el crecimiento de *biofilm* sobre las superficies mineras, lo que las protege contra la solubilización y por consiguiente, reduce la formación de compuestos sulfurosos y el transporte de los metales. Sin embargo, este mecanismo es el menos desarrollado y ejecutado en operaciones mineras (Kim & Park, 2022; Smith *et al*., 2023).

Es así, que surge esta alternativa para el proceso de cierre de mina, que busca reducir las generaciones del DAM, con la ayuda de microorganismos y comportándose como una pared viva que impida el contacto directo entre el agua y la roca expuesta. Que podría ser de gran utilidad en la biorremediación, promoviendo la estabilización del suelo y potenciando las condiciones de un micro-hábitat para la colonización de otros integrantes permanentes que complementan la formación del *biofilm* (Syed *et al*., 2022).

El término *biofilm* o biopelícula, define a las comunidades de microorganismos (que pueden ser bacterias, hongos, protozoos o microalgas) organizándose en

colonias, que crecen dentro de una matriz extracelular (MEC) que ellos producen. Dicha matriz les proporciona resistencia al estrés ambiental, desinfecciones o condiciones hostiles en diferentes microambientes adversos. Esto se debe aque tiene la propiedad de adherirse a diferentes superficies, sean lisas, rugosas, blandas, animadas o inertes (Escandón & Peña, 2022; Bunyan, 2020; Oliveira *et al*., 2020).

El objetivo de este trabajo fue la identificación y caracterización de microorganismos con potencial para formar biopelículas sobre superficies mineras que permitan mitigar la generación del drenaje ácido de mina (DAM), presentándose ciertas limitaciones cuando se basa exclusivamente en métodos microbiológicos clásicos, los cuales subestiman la diversidad microbiana al depender del cultivo *in vitro*. En este contexto, resulta indispensable complementar estos enfoques con herramientas avanzadas de biotecnología molecular, como la secuenciación masiva del ADN ambiental (metagenómica), que permiten acceder al perfil taxonómico y funcional de las comunidades microbianas presentes en tajos y suelos mineros, optimizando así su monitoreo y selección para aplicaciones de biorremediación.

Asimismo, se aislaron microorganismos nativos capaces de colonizar las rocas formando biopelículas protectoras, cuyos consorcios más eficientes presenten la característica de elevar el pH de rocas procedentes de tajos mineros, bajo condiciones controladas.

II. Revisión de la literatura

2.1. Conceptos teóricos

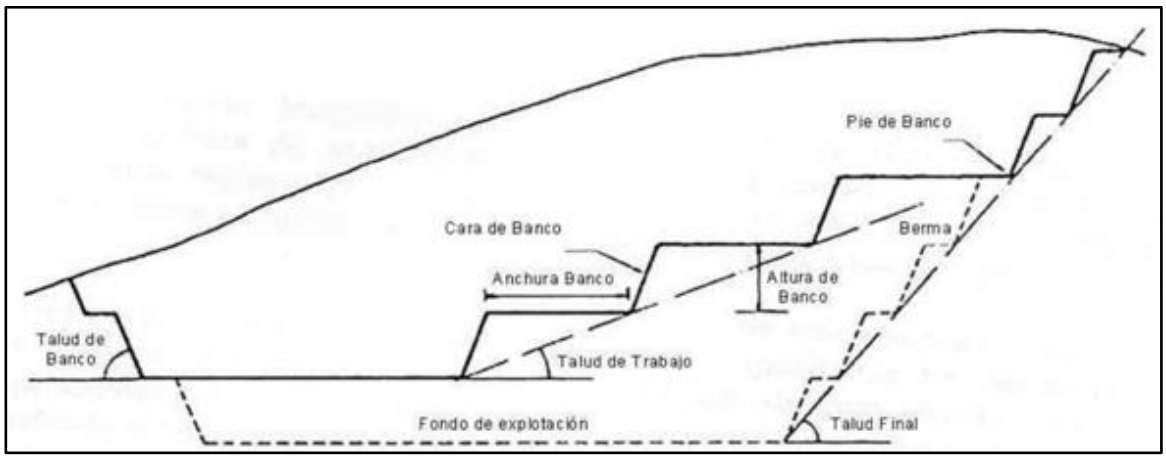
2.1.1. Minería

A. Mina de tajo abierto

La minería a tajo abierto de metales preciosos es un método extractivo que no recurre a excavaciones subterráneas y, en su lugar, remueve grandes volúmenes de la superficie terrestre para acceder al mineral de interés. Este proceso implica el uso intensivo de explosivos y la aplicación de agentes químicos lixiviantes (cianuro, mercurio), con el fin de separar los metales valiosos de las rocas. Como consecuencia, se generan soluciones residuales altamente contaminantes que se almacenan en lagunas de lixiviados por largos periodos. En ausencia de un manejo adecuado, estos cuerpos pueden representar un riesgo significativo de contaminación para los acuíferos cercanos y otros componentes del ecosistema (Gaytán & Núñez, 2022).

Figura 1

Terminología de una explotación a tajo abierto



Nota. Tomado de Minería subterránea y superficial y beneficio de minerales en el Perú, por H. Luna, 2011, Ministerio de Energía y Minas. Copyright 2011 por Ministerio de Energía y Minas.

Para la extracción de una mina a cielo abierto, requiere diseñar el tajo y el avance progresivo de las labores mineras mediante actividades topográficas (Figura 1). Posteriormente intervienen las labores de transporte de minerales a áreas de almacenamiento y materiales estériles (Castellano et al., 2020).

B. Suelos mineros

Topsoils

Son las capas superficiales del suelo que se encuentran justo por encima del horizonte rocoso o subyacente. Estas capas concentran una mayor cantidad de materia orgánica, nutrientes, microorganismos y raíces en comparación con los estratos más profundos, lo que las convierte en la parte más fértil y biológicamente activa del suelo (Maiti & Ahirwal, 2019). Durante actividades como la minería, los topsoils son removidos y almacenados en montículos o pilas para su posible reutilización en procesos de restauración del terreno. Este almacenamiento debe realizarse con cuidado, ya que el paso del tiempo, la compactación y la falta de oxígeno pueden deteriorar sus propiedades físicas, químicas y microbiológicas, reduciendo su fertilidad y efectividad en la rehabilitación ecológica (Madline *et al*., 2025).

Technosoils o tecnosuelos

Son suelos artificiales o reconstruidos, elaborados a partir de una mezcla de materiales como topsoil almacenado (cuando está disponible y en condiciones de ser recuperado), fragmentos de roca, estériles de mina, compost, lodos orgánicos u otros enmiendas que mejoran la calidad del suelo (Pennock, 2019).

Estos suelos se crean en contextos donde el topsoil original ha sido degradado por actividades extractivas, ha perdido su capacidad para retener nutrientes y agua, carece de su microbiota nativa esencial para la salud del ecosistema o simplemente no se encuentra en cantidad suficiente. Su objetivo principal es restaurar la funcionalidad ecológica del suelo, mejorando sus propiedades físicas, químicas y biológicas. Esto facilita la revegetación y la recuperación ecológica de áreas impactadas, como los tajos mineros, estabiliza el terreno

y contribuye a la mitigación de impactos ambientales como la generación de drenaje ácido de mina (DAM) (König *et al*., 2023; Li *et al*., 2021).

C. Drenaje ácido de minara 1

Muchas rocas del subsuelo contienen sulfuros, especialmente pirita (FeS_2). Bajo tierra casi no reaccionan porque el oxígeno y el agua son escasos. Cuando la minería las extrae y tritura, las expone al aire: el sulfuro se oxida, el azufre se convierte en ácido sulfúrico y este disuelve los metales tóxicos de la roca. Luego, la lluvia o las filtraciones arrastran esa solución ácida y metálica hacia los ríos y los suelos (Jiao *et al*., 2023; Otunola *et al*., 2024).

Es por ello, que el drenaje ácido de mina o DAM es una de las fuentes más importantes de contaminación de las aguas superficiales y subterráneas. Presentan un pH muy bajo, además contienen grandes cantidades de sólidos en suspensión con elevado contenido de sulfatos y elementos como Al, Cd, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Zn, los cuales, en altas concentraciones son peligrosos para el ambiente y podrían dañar estructuras construidas por el hombre (Chang *et al*., 2024).

2.1.2. Microbiología

A. Bacteria

Se integran en el reino de los procariotas (pro: primitivo y cariota: núcleo), son organismos unicelulares, de pequeño tamaño (entre 0,2 y 5 µm de diámetro), se reproducen por fisión binaria, presentan una membrana plasmática protegida por una pared rígida con diferentes estructuras superficiales (flagelos, pili, etc.), sin embargo, no presentan membrana nuclear, organelos, ni otros tipos de compartimentos internos. Su genoma es, de pequeño tamaño y sencillo. Su único cromosoma compuesto por una molécula circular de ADN, adherida a la membrana, constituye la zona nucleoide, sin estar limitada por alguna membrana (Britannica, 2025).

B. Cianobacteria

Las cianobacterias son organismos microscópicos procariotas, clasificados como Gram-negativos, que contienen clorofila y realizan fotosíntesis. Se les ha identificado generalmente como algas verdeazuladas. Pueden ser unicelulares o formar colonias. Están presentes en diversos hábitats, como en aguas saladas, dulces, salobres y zonas de mezcla (Prescott *et al*., 2021). Las cianobacterias son unos de los pocos microorganismos que realizan la fijación del nitrógeno, cuentan con la posibilidad metabólica de realizar este costoso proceso energético de convertir el nitrógeno gaseoso a una forma biológicamente útil como el amoníaco (Madigan *et al*., 2021).

C. Hongos

El rol de los hongos en los ciclos biogeoquímicos suele estudiarse superficialmente. Son heterótrofos cuya pared celular está compuesta por quitina. Estos incluyen microorganismos (levaduras y mohos) y organismos macroscópicos con setas o cuerpos fructíferos. Se reproducen por la dispersión de esporas en el suelo, el aire o agua. Colonizaron la tierra aproximadamente hace 400 millones de años. En los ecosistemas terrestres, desempeñan principalmente tres funciones ecológicas: descomposición, mutualismo y parasitismo. Respecto al mutualismo, se puede afirmar que, además de líquenes, los hongos micorrícicos, forman simbiosis con más del 90 % de las plantas vasculares, provocando su colonización y diversificación en el planeta (Gadd, 2017).

D. Microalgas

Son un grupo extenso y diverso de microorganismos acuáticos que carecen de estructuras celulares complejas como las de las plantas superiores. Son unicelulares pero presentan núcleo y organelos característicos de una célula eucariota. Algunas están rodeadas únicamente por una membrana plasmática, que podría estar envuelta en mucílago, pero muchas de ellas están rodeadas por una pared celular, cuya forma y composición es muy variable, los más comunes son celulosa, sílice, carbonato cálcico o proteína.

Puede consistir en una o más piezas, e incluso algunas llevan cuerpos calcificados (cocolitos). La mayoría son fotoautótrofas. En cuanto a la reproducción, suele darse por división binaria, con tiempos de duplicación que oscilan generalmente entre 8 a 24 h. La reproducción sexual presenta una frecuencia variable, aunque siempre es menos frecuente que la asexual (Raven *et al*., 2022).

E. Biofilm

Se denomina biopelícula (*biofilm*) a la asociación de microorganismos que, tras adherirse a un sustrato, quedan dentro de una matriz extracelular que ellos mismos producen. Dentro de esta estructura, las células experimentan cambios fenotípicos en su tasa de crecimiento y expresión génica. Un *biofilm* puede estar integrado por una o diversas especies bacterianas o fúngicas, o bien por una comunidad compleja de varios grupos microbianos. Sus ventajas incluyen la fuerte afinidad a superficies inertes o vivas, colonización, cooperación metabólica, captura eficiente de nutrientes, comunicación entre células y mayor tolerancia a estresores físicos, químicos y biológicos, lo que permite que la comunidad microbiana sobreviva a condiciones críticas (Flemming & Wuertz, 2019).

Fases de formación de *biofilm*s

La formación de *biofilm*s están influenciados por factores como las condiciones ambientales, los nutrientes presentes, las características propias de las especies, su comunicación celular, metabolismo y su regulación genética. El desarrollo de las *biofilm*s es un proceso que se divide en tres etapas, las cuales se detallarán a continuación: (Sharahi *et al*., 2019; Ahmed *et al*., 2022).

i. Contacto inicial o adhesión:

Las células al percibir una superficie adecuada, empiezan a formar una unión por medio de fibrillas poliméricas extracelulares. La colonización incrementa al aumentar la aspereza de la superficie (Figura 2.a) (Kobayashi *et al*., 2022).

ii. Maduración:

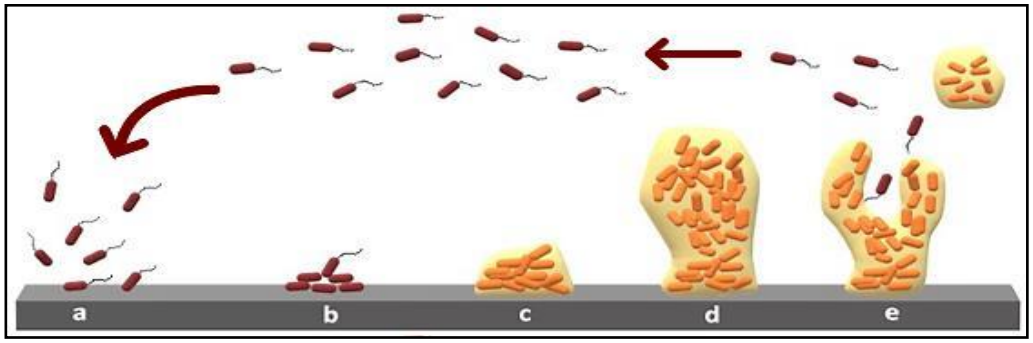
Durante la fase de crecimiento, se forma una unión de manera irreversible, colonizando la superficie, fomentando la división celular, multiplicándose alrededor del sitio de unión, es donde la monocapa (Figura 2.b) se convierte en una microcolonia (Figura 2.c). Empieza la producción de la matriz extracelular, creando una comunidad más diversa. A medida que la biopelícula madura, se producen interacciones genéticas que modificarían la velocidad de crecimiento, lo que la ralentizaría debido a la limitación de recursos (Figura 2.d) (Flemming & Wuertz, 2019).

iii. Dispersión:

Finalmente, en la tercera etapa, tras condiciones adversas, sucede el escape de la matriz, ya sea aisladamente o en conglomerados. Durante esta fase ocurren procesos como la muerte celular, degradación de la matriz por enzimas y recuperación de la motilidad, permitiendo que la dispersión logre colonizar nuevas superficies. Se diferencian dos tipos: la que se produce por procesos inducidos por éste y la que se origina por fuerzas externas cuando se identifican signos de estrés ambiental. Las señales pueden ser inducidas por la disminución de nutrientes, oxígeno o presencia de agentes tóxicos en el ambiente (Figura 2.e) (Ramakrishnan *et al*., 2022).

Figura 2

Ciclo de vida del biofilm



Nota. a) Primer contacto con la superficie (fase reversible), b) Adhesión irreversible, c) Multiplicación celular (microcolonias) y generación de matriz, d) Maduración, e) Dispersión celular. Adaptado de Wei y Ma (2013).

Los mecanismos principales para lograr el desprendimiento serían: (a) erosión o deslizamiento: desprendimiento contínuo de pequeños fragmentos del *biofilm*; (b) separación: remoción masiva y más rápida; para que logren migrar de áreas densamente colonizadas a zonas que podrían favorecer su desarrollo, y (c) abrasión: desprendimiento de partículas del fluido circundante con la biopelícula (Azeem *et al*., 2025).

2.1.3. Biología Molecular

1) Definiciones

A. Genómica

Es una rama de la genética que tiene como objetivo comprender el contenido, la función, la organización y la evolución de la información molecular del ADN del genoma completo. Se divide en dos: 1) la genómica estructural, y la 2) la genómica funcional (Arvi *et al*., 2024; Ludwig & Spielmann, 2022).

B. Taxonomía molecular

Es una rama de la biología que utiliza datos genéticos y moleculares (principalmente secuencias de ADN, ARN o proteínas) para identificar, clasificar y establecer la diversidad biológica y relaciones evolutivas entre organismos. A diferencia de la taxonomía clásica, que se basa en características morfológicas, como forma, tamaño, color, etc. la taxonomía molecular permite una clasificación más precisa y objetiva, incluso entre organismos muy similares visualmente o que no pueden cultivarse en laboratorio. Esta disciplina facilita el estudio de comunidades microbianas complejas, como las presentes en suelos, océanos o el intestino humano, y contribuye al descubrimiento de nuevas especies (Porter & Hajibabaei, 2018).

Entre sus principales métodos se encuentran la secuenciación de genes conservados, como el gen 16S rRNA en bacterias o el gen COI en animales,

la comparación de secuencias genéticas para medir la similitud entre especies y la construcción de árboles filogenéticos que representan relaciones evolutivas (Abarenkov *et al*., 2024).

C. eDNA (ADN ambiental)

El ADN ambiental (eDNA) es el material genético que los organismos liberan al entorno a través de células muertas, excreciones, secreciones o fragmentos de tejido. Este ADN se encuentra libre en muestras ambientales como agua, sedimentos, suelo e incluso aire. El eDNA se utiliza principalmente en el estudio de comunidades biológicas complejas, ya que permite identificar la diversidad de organismos presentes sin necesidad de aislarlos ni cultivarlos. Esto contrasta con el uso de ADN de tejido puro donde el material genético proviene de un solo organismo o cepa, y se emplea principalmente en estudios individuales o taxonómicos específicos. Es especialmente útil para el análisis de comunidades microbianas mixtas o consorcios microbianos (Vela & Centeno, 2020).

D. ARNr

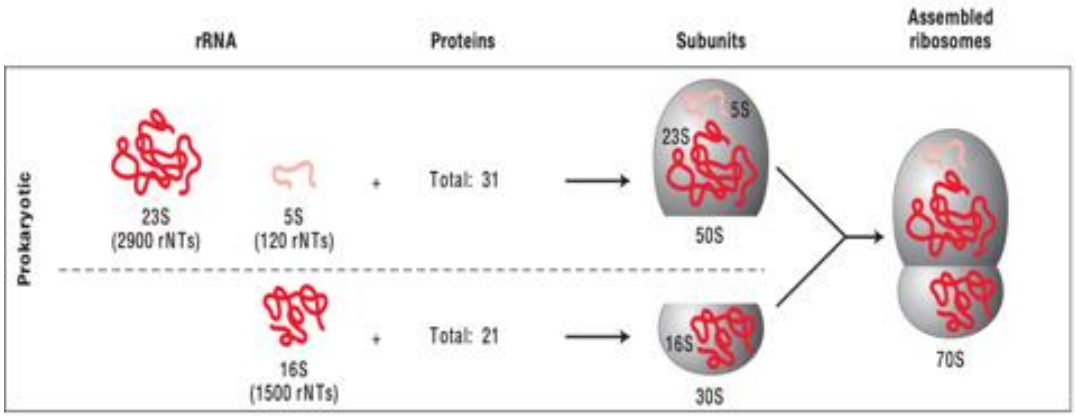
El gen codificante de ARN ribosomal (ARNr) corresponde a una región conservada del ADN que contiene la información necesaria para la síntesis de los ARNr, componentes esenciales en la maquinaria de traducción celular. Los ARNr son moléculas de ARN no codificante que conforman la estructura básica y funcional de los ribosomas, donde se lleva a cabo la síntesis de proteínas. Su secuencia presenta un alto grado de conservación evolutiva, lo que los convierte en una herramienta clave para estudios filogenéticos y de identificación microbiana (González *et al*., 2015).

Son la variante de mayor peso molecular; su conformación y tamaño son constantes en las células. Son componentes importantes de los ribosomas, que está formado por dos subunidades, que se conocen como sub-unidad mayor y menor. En procariotas se describen tres ARNr diferenciados por sus velocidades de sedimentación como 23S, 16S y 5S (S corresponde a

unidades de Svedberg), mientras que en eucariotas se identifican los 18S, 28S, 5.8S y 5S (Figura 3) (Brown *et al*., 2014).

Figura 3

Estructura del ribosoma en procariota



Nota. Tomado de Biología celular y molecular (5.ª ed.), por H. Lodish, 2006, Editorial Médica Panamericana. Copyright 2006 por Editorial Médica Panamericana.

16S ARNr

En la década de 1990, con el surgimiento de técnicas para extraer ADN directamente de muestras ambientales, como suelo y agua de mar, los investigadores comenzaron a examinar la diversidad de secuencias de microorganismos utilizando el gen universal de ARN ribosomal 16S como marcador taxonómico (Clarridge, 2004).

El gen 16S rRNA, en particular, ha sido ampliamente utilizado en estudios de taxonomía molecular y metagenómica, debido a sus regiones conservadas e hipervariables que permiten discriminar entre diferentes especies bacterianas, estudiar la diversidad microbiana, construir árboles filogenéticos y detectar microorganismos no cultivables (Kislichkina *et al*., 2024).

E. Gen ribosomal ITS

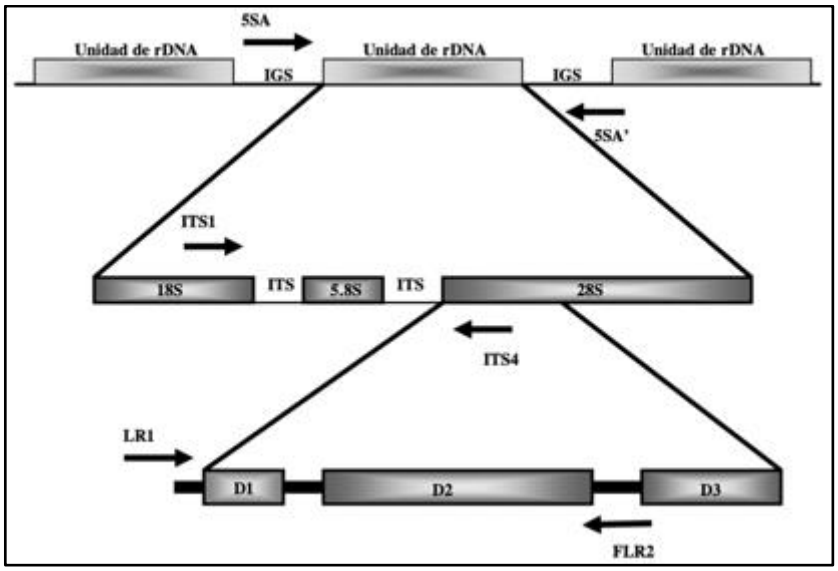
Las siglas corresponden a "*Internal Transcribed Spacer*" (espaciador transcrito interno), una región no codificante del ADN ribosomal que, aunque

es transcrita, se elimina durante el procesamiento del ARN ribosómico (rRNA). El ITS está compuesto por dos subregiones principales: ITS1, ubicada entre los genes 18S y 5.8S, y ITS2, situada entre los genes 5.8S y 28S (Figura 4) (Usyk *et al*., 2017).

Estas regiones están flanqueadas por secuencias altamente conservadas. Sin embargo, la secuencia del ITS, aunque varía considerablemente entre especies, se mantiene relativamente conservada dentro de una misma especie, lo que la convierte en una herramienta molecular confiable para estudios de taxonomía molecular, identificación de especies y análisis filogenético. Gracias a esta variabilidad interespecífica, el ITS permite ubicar hongos desconocidos dentro de una especie o, al menos, dentro de un grupo filogenético afín (Kauserud, 2023).

Figura 4

Genes ribosomales y sus espacios interunidades, espacios intergénicos y dominios de la subunidad grande



Nota. Adaptado de Gardes y Bruns (1993); Van Tuinen *et al*. (1998); y Jacquiot *et al*. (2000).

F. Metagenómica

También conocida como genómica ambiental, se enfoca en el análisis de los genomas de todas las comunidades microbianas presentes en una muestra

ambiental, sin requerir aislamiento o cultivo previo. El metagenoma comprende el conjunto total de secuencias genéticas, incluyendo ADN intracelular y fragmentos extracelulares, lo que permite identificar microorganismos mayoritariamente no cultivables mediante técnicas convencionales (Fadiji & Babalola, 2020).

En la actualidad, se han estudiado metagenomas de ambientes diversos, que incluyen ecosistemas acuáticos, suelos mineros, forestales y agrícolas, aportando aspectos interesantes de la ecología microbiana en un ecosistema específico. (Alam *et al*., 2021; Schniete & Fernández, 2024).

Tipos de metagenómica

Metagenómica dirigida

La metataxonomía, también conocida como análisis de amplicones, se basa en la amplificación y secuenciación de genes marcadores como el 16S rRNA en bacterias o el ITS en hongos, con el objetivo principal de identificar taxonómicamente los microorganismos presentes en una muestra ambiental. Esta técnica ofrece alta resolución taxonómica y requiere menor costo computacional. Sin embargo, no proporciona información directa sobre las funciones metabólicas o funcionales de la comunidad microbiana (Ojala *et al*., 2023).

Metagenómica tipo shotgun

En esta aproximación, se secuencian aleatoriamente todos los fragmentos de ADN presentes en una muestra ambiental, sin necesidad de amplificar genes específicos. A diferencia de métodos dirigidos, permite tanto la identificación taxonómica de los microorganismos como el análisis funcional, incluyendo la predicción de rutas metabólicas, genes de resistencia a antibióticos y otras funciones genéticas. Además, esta técnica posibilita la reconstrucción parcial o completa de genomas microbianos (metagenomas), proporcionando una visión integral de la composición y el potencial funcional de la comunidad microbiana. Sin embargo, requiere una mayor cantidad y calidad de ADN, así como un alto poder computacional y un mayor costo

económico, debido a la complejidad de los análisis bioinformáticos involucrados (Santamarina *et al*., 2024).

G. Next Generation Sequencing (NGS)

O secuenciación de proxima generación es un conjunto de tecnologías diseñadas para la secuenciación masiva y paralela de fragmentos de ADN, a menor costo y tiempo. Se utilizó originalmente para secuenciar fragmentos de ADN desconocidos o para detectar polimorfismo nucleótido, inserciones o delaciones. En la actualidad, las tecnologías de NGS se plantean como herramientas de gran utilidad para diferentes aplicaciones, secuenciamiento de genomas, caracterización de comunidades microbianas y a un menor costo (Rubio *et al*., 2020).

2) Técnicas

A. Extracción de ADN

La extracción de ADN es un método que consiste en la separación y purificación de esta molécula, basándose en las propiedades fisico-químicas. El ADN está compuesto por dos cadenas de nucleótidos integradas por azúcares (desoxirribosa), grupos fosfato y bases nitrogenadas (adenina, timina, citosina y guanina). Los grupos fosfato presentan cargas negativas y son polares, por ellos, el ADN es altamente polar negativamente cargado. Estas características son aprovechadas para facilitar su extracción y purificación (Reinoso *et al*., 2022).

Con el tiempo se diseñaron distintos protocolos bajo el objetivo de la obtención de una cantidad y calidad adecuada de ADN, garantizando la eliminación de potenciales inhibidores que obstaculicen un mejor procesamiento de la molécula. Los métodos tradicionales, utilizaron solventes orgánicos para separar las proteínas del ADN. Estos protocolos presentan cinco pasos principales: homogeneización de tejidos, lisis celular, separación de proteínas y lípidos, precipitación y resuspensión del ADN.

Estos métodos pueden tardar horas o varios días por los numerosos pasos que se realizan (Sambrook *et al*., 1989).

Posteriormente, al mercado se introdujeron kits de extracción, los cuales usan matrices inorgánicas compactas con cargas positivas capaces de capturar microgramos de ADN y separarlos de otras biomoléculas, obteniendo como resultado una extracción sin inhibidores (Alejos *et al*., 2014).

En la extracción por kit, el ADN de carga negativa se adsorbe reversiblemente en la matriz, manteniéndose adherido a ella durante la eliminación de proteínas, lípidos y otros metabolitos secundarios, luego la molécula es liberada de la matriz. Los kits comerciales disminuyen el tiempo de este procedimiento, reduciendo el número de pasos, utilizándose bajo las recomendaciones del fabricante, garantizan una alta pureza, siendo muy eficientes para recuperar el ADN y la remoción de los contaminantes. La elección del método de extracción más adecuado es fundamental en las técnicas moleculares y dependerá del objeto de investigación, el estado de conservación, el tejido disponible, la infraestructura del laboratorio, el tiempo para la obtención de resultados y los recursos económicos (Qiagen, 2005; Invitrogen, 2005; Reinoso *et al*., 2022).

B. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

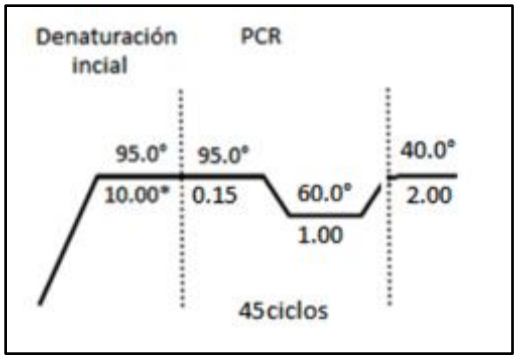
La introducción de la PCR por Kary Mullis en 1983 revolucionó todas las áreas de investigación biológica. A sus inicios esta técnica era bastante tediosa y costosa, pero actualmente es una herramienta utilizada de rutina en los laboratorios (Bartlett & Stirling, 2003).

Esta técnica, inspirada de la replicación celular natural, utiliza gradientes de temperatura para la obtención de copias múltiples de una región específica de ADN por medios bioquímicos. Para ello, se necesita de algunos reactivos, cómo la enzima polimerasa y su buffer, los iniciadores o *primers*, dNTPs, $MgCl_2$, agua ultrapura y el ADN molde (*template*). El método consta de tres fases que conforman un ciclo que se repite. La PCR normalmente posee 35 a 45 ciclos. La primera fase es la desnaturalización, donde se separan las

hebras de ADN, debido a la ruptura de los puentes de hidrógeno que las mantiene unidas, esto es causado por someter a la reacción una alta temperatura (94-95 °C). La segunda fase es la hibridación o *annealing*, cuando el *primer* se une muy específicamente al ADN molde. Esta fase es fundamental, puesto que, si no se ancla el *primer* correctamente, no se amplificará, obteniendo resultados de falsos negativos, lo que requiere encontrar una temperatura de hibridación adecuada, que generalmente oscila entre 45 y 65 °C o un buen diseño de *primer*. La tercera y última fase es la extensión. Es dónde la polimerasa sintetiza una nueva hebra de ADN a partir del anclaje del *primer*. Habitualmente, está fase presenta una temperatura de 72 °C (Figura 5) (Chirinos, 2015).

Figura 5

Protocolo de amplificación por PCR



Nota. Tomado de la Guía de PCR en tiempo real, por E. Chirinos, 2015

C. Electroforesis

La electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida es una metodología muy utilizada en el laboratorio. Esta herramienta permite separar en función del tamaño, moléculas de ADN, ARN o proteínas, que son visualizadas en forma de “bandas” mediante una tinción. En función de la ubicación e intensidad de estas bandas, se puede determinar el tamaño de las moléculas así como su cantidad relativa (Sambrook & Russell, 2006).

Se centra en la capacidad de las macromoléculas cargadas para moverse en un campo eléctrico, con una velocidad proporcional a su carga e inversamente proporcional a su tamaño. Las moléculas de ADN presentan

una carga negativa uniforme por unidad de masa en pH neutro o alcalino, lo que genera que su movilidad hacia el ánodo (+) está determinada únicamente por el tamaño de la molécula (Sonagra & Dholariya, 2022).

2.2. Antecedentes

Debido a que el estudio de la formación de biopelículas microbianas en ambientes mineros es un campo emergente, la bibliografía específica es limitada. Por esta razón, se consideran aquellos antecedentes que más se acercan al enfoque de este trabajo.

Tal como Barral *et al*. (2018) investigaron la interacción entre el arsénico y el *biofilm* en un río afectado por la minería, realizando la translocación de *biofilm*s con 51 días de duración en este río, moviendo algunos sustratos colonizados por *biofilm*s desde río arriba del área de la mina (menos contaminado con As) hasta río abajo (más contaminado), para explorar el efecto del As en los *biofilm* bentónicos, así como su papel en la especiación y retención de As en la interfase agua-sedimento. Detectando condiciones eutróficas en el agua de ambos sitios.

Por otra parte, Méndez *et al.* (2019), realizaron un monitoreo electroquímico de la formación de *biofilm*s de *Acidithiobacillus thiooxidans* en superficies de grafito como soporte con azufre elemental como única fuente de energía, puesto que se conoce que el desarrollo del *biofilm* en condiciones ácidas puede mejorar las aplicaciones en procesos electroquímicos en compuestos de azufre. Las condiciones experimentales elegidas en este trabajo permitieron el monitoreo del crecimiento del *biofilm*, así como la modificación de la composición de las Sustancias Poliméricas Extracelulares (SPE).

Schwarz *et al.* (2020), evaluaron un sistema de biopelícula sobre membrana diseñado para la conversión de sulfato (SO_4^{2-}) en azufre elemental (S^0) en aguas impactadas por actividades mineras. En su estudio, se ensayaron dos tipos de reactores con *biofilm* de membrana, demostrando su eficacia para transformar el sulfato presente en el agua de proceso minero en partículas de azufre elemental, mediante procesos biológicos controlados.

Posteriormente, los reactores fueron acoplados por un flujo de recirculación, evitando la acumulación de sulfuro y proporcionando una mayor eliminación de sulfato y producción de S0. Sin embargo, el acoplamiento de recirculación exigía una mayor entrega de H_2 y O_2 (en el aire) debido al establecimiento de un ciclo de azufre catalizado por *Sulfurospirillum* spp.

Mientras que Buetti-Dinh *et al.* (2020) destacan que la adhesión celular y la formación de biopelículas en la superficie mineral son etapas clave en la biominería, ya que promueven una mayor oxidación del mineral. Aunque la biominería de calcopirita suele realizarse en pilas a gran escala, estas presentan baja eficiencia en la recuperación de metales. Para abordar estas limitaciones, el estudio analizó tanto células planctónicas como células integradas en biopelículas de bacterias acidófilas biomineras, organismos cuyo crecimiento óptimo se da en condiciones extremadamente ácidas (pH < 3), con el fin de optimizar la extracción metálica. Se extrajeron ARN y proteínas para llevar a cabo análisis ómicos a partir de 80 experimentos en total. Asimismo, se obtuvieron micrografías que documentan la formación y evolución de biopelículas sobre calcopirita en el tiempo, derivadas de ocho experimentos independientes.

Christel *et al.* (2017), analizaron biopelículas de sedimentos y costras eflorescentes (CFE) en un sistema de drenaje ácido de mina (DAM), mediante metagenómica 16S. El estudio se centró en evaluar la capacidad de disolución de relaves de carbón y CFE por bacterias presentes en dichas biopelículas. Los resultados revelaron un predominio de bacterias acidófilas, muchas de las cuales están asociadas con la oxidación de sulfuros y la generación de DAM. Estas biopelículas demostraron una alta capacidad para lixiviar metales como Co, Fe y Zn, reduciendo el pH y acelerando la disolución mineral, especialmente en CFE. Frente a la lixiviación abiótica, el proceso biológico aumentó la proporción de especies metálicas hidratadas libres frente a complejos inorgánicos, lo que sugiere el potencial de las biopelículas para mejorar la dispersión de metales en sistemas acuáticos.

Finalmente, Bobadilla & Poblete (2021), evaluaron la formación de biopelículas en condiciones de flujo laminar y turbulento, evaluando su

influencia en la dinámica mineralógica durante la biolixiviación de sulfuros de cobre a 30 °C. El régimen laminar favoreció la formación de biopelículas sobre bornita (Cu_5FeS_4) con una comunidad de Leptospirillum spp. y Acidithiobacillus thiooxidans, mientras que en calcopirita ($CuFeS_2$) y bajo condiciones turbulentas no se observaron biopelículas. La presencia de Fe^{3+} aceleró la lixiviación, a diferencia del Fe^{2+}, que la retrasó significativamente. La formación de biopelículas duplicó la eficiencia de recuperación de cobre. Se destacó el rol de *A. thiooxidans* en la superficie mineral y se propuso un mecanismo basado en la regeneración microbiana de azufre a ácido sulfúrico como clave para evitar la precipitación de hierro y mejorar dicho proceso.

En conjunto, estos estudios demuestran que los *biofilm*s poseen un potencial significativo para interactuar con compuestos tóxicos, mediar procesos de transformación química y formar estructuras biológicas estables que podrían ser aprovechadas en contextos mineros. Sin embargo, la escasa cantidad de antecedentes disponibles revela un vacío de conocimiento en esta área, especialmente en lo referente a su aplicación en ambientes mineros reales. Esta investigación contribuye a llenar ese vacío, aportando evidencia experimental que respalda la viabilidad del uso de consorcios microbianos en estrategias sostenibles para mejorar la eficiencia y reducir el impacto ambiental de los proyectos mineros.

III. Metodología

Esta investigación forma parte de un proyecto más amplio realizado en el marco del "Convenio de cooperación interinstitucional para la aplicación de biotecnologías moleculares como componente estratégico para la sostenibilidad de las actividades mineras del grupo Buenaventura", entre diferentes empresas mineras pertenecientes al grupo Buenaventura y la empresa Incabiotec SAC.

El tipo de investigación fue descriptivo–mixto, ya que se centró en la descripción de los hechos observados y, al mismo tiempo, se incorporó métodos cualitativos para la recolección y análisis de datos, con el fin de obtener una visión más completa del estudio. El diseño de investigación fue experimental, lo que implicó la manipulación deliberada de una o más variables independientes (microorganismos nativos, cultivables y formadores de biofilm) para analizar su efecto sobre una o más variables dependientes (la capacidad de colonizar rocas sulfúricas y el pH del agua que interacciona con la roca), dentro de un entorno controlado.

El estudio se llevó a cabo en un periodo de 5 meses a escala del laboratorio para los análisis microbiológicos, genómicos y metagenómicos en el Centro de Investigación Incabiotec S.A.C, ubicado en el Departamento de Tumbes.

Actividad 1: Recolección de muestras del tajo y suelo de las operaciones mineras auríferas "Mineria La Zanja" (MLZ) y Coimolache S.A. (CMC)

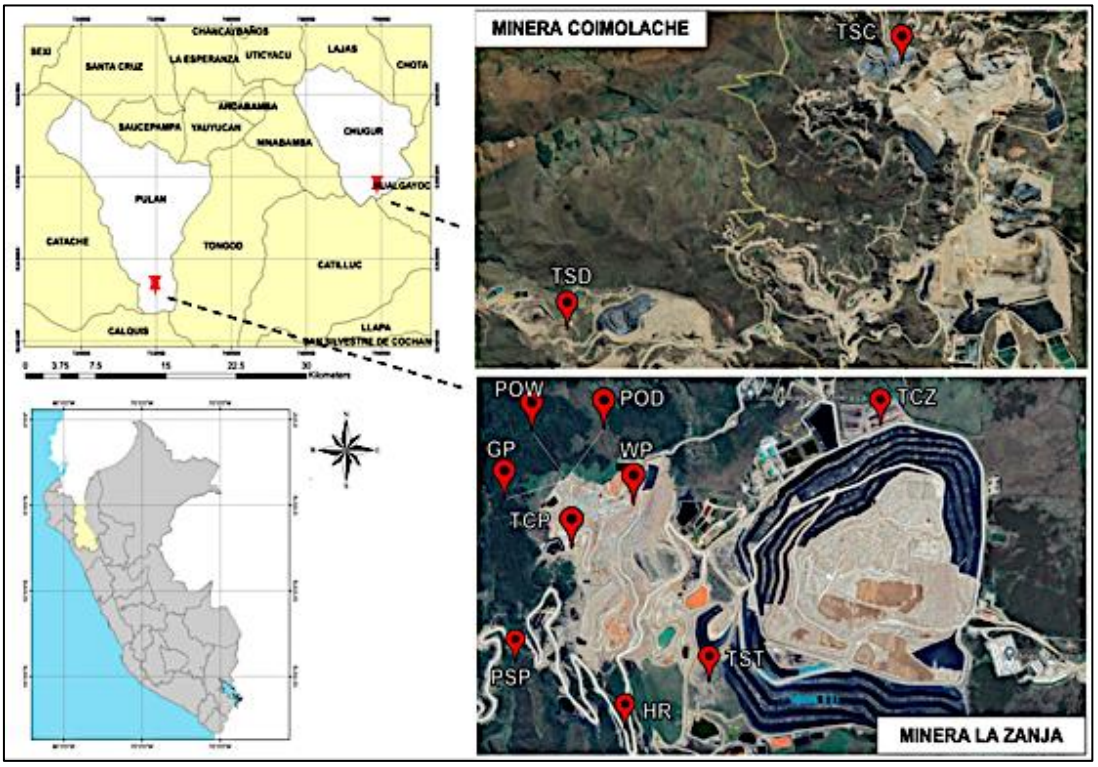
Las muestras se recolectaron en Minera La Zanja S.R.L. (MLZ), el cual se encuentra ubicado en el caserío La Zanja, en el distrito de Pulan, provincia de Santa Cruz y también dentro de la Compañía Minera Coimolache S.A. (CMC), situada en el distrito de Chugur, provincia de Hualgayoc, ambas explotaciones pertenecen al departamento de Cajamarca (Figura 6).

Las muestras se recolectaron dentro y alrededor de las operaciones mineras: suelo prístino (PSP) ubicado entre MLZ y CMC, suelos desplazados y apilados (capa superior) del depósito DMO en MLZ (TSO), capa superior del depósito Coimolache (TSC), capa superior del depósito 1 en CMC (TSD), capa superior del suelo recientemente enmendado (tecnosuelo) preparado a partir de la capa superior del suelo de MLZ (TCZ) y tecnosuelo enmendado de ocho meses dispuesto y sembrado con *Lolium* sp., *Trifolium* sp., *Festuca* sp., *Vicia* sp., *Lupinus* sp. y *Cytisus* sp. (TCP).

Los puntos de muestreo fueron georeferenciados (Anexo 1). En cada uno se recuperaron cinco submuestras para la obtención de una muestra compuesta que sumaba 1 kg. El muestreo siguió los lineamientos propuestos por la Dirección General de Calidad Ambiental del Ministerio del Ambiente (2014).

Figura 6

Ubicación geográfica de los puntos de muestreo en las operaciones mineras La Zanja y Coimolache



Nota. El mapa fue creado a partir de datos del GeoServidor del Ministerio del Ambiente del Perú (https://geoservidor.minam.gob.pe) y editado con ArcGIS 10.7.1 (versión 2019).

Las muestras de los tajos se recolectaron de paredes visualmente diferenciados utilizando hisopos estériles en 0,25 m^2 del tajo en MLZ y se conservaron en medio líquido BG11. Se muestrearon tajo seco “naranja” (POD), tajo húmedo “naranja” por filtración de agua (POW), agua colectada del tajo (WP), tajo seco “gris” (GP) y tajo de camino, tajo adyacente a la carretera (HR). Sin embargo, no se recolectaron muestras de los tajos del sector de Coimolache debido a precipitaciones que alteraron las condiciones. Las muestras se mantuvieron a 4°C hasta llegar al laboratorio y se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

Actividad 2: Caracterización metagenómica de las comunidades microbianas estudiadas

Se llevó a cabo el estudio metagenómico de las diferentes muestras con la finalidad de conocer la diversidad de microorganismos presentes en la misma.

a. Extracción de ADN metagenómico

La extracción total de ADN metagenómico se realizó utilizando el Power Soil DNA Isolation Kit (MOBIO Laboratories Inc., Carlsbad, CA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, que recomienda utilizar 0,25 g de muestra.

b. PCR dirigidas a los genes 16S e ITS

Los códigos de secuenciación metabarcoding se generaron mediante PCR amplificando la región hipervariable V4 del gen 16S rRNA utilizando los cebadores 515F/806R para bacterias. Para hongos, las regiones variables ITS1 e ITS2 se amplificaron utilizando los cebadores ITS1F/ITS2R (Wu *et al*., 2019).

La PCR de un solo paso se llevó a cabo utilizando el kit HotStar Taq Plus Master Mix (Qiagen, EE. UU.), en un tampón de amplificación que consta de un volumen total de 20 µL conteniendo 8 µL de agua ultra pura, 10 ul de GoTaq Green Master mix REF.M7123 (taq polimerasa; tris TRIS HCL; MgCl2; dNTPs; Taq polimerasa), 0.5 uL de cada cebador y 1 µL de ADN en suspensión. El proceso de amplificación del gen 16S consta de una desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 min, luego se lleva a cabo 35 ciclos de amplificación, donde un

ciclo conlleva una desnaturalización a 95 °C durante 30 s, seguido de 58 °C a 30 s para la hibridación de *primer*s, y 72 °C por 1 min para la elongación, con una extensión final a 72 °C durante 5 min.

La PCR para el gen ITS fue utilizado el Master mix agregándose 8 µL de agua ultrapura (AUP), 10 µL del Master Mix, 0.5 µL de Forward, 0.5 µL de Reverse y 1 µL de ADN extraído de cada microorganismo, obteniendo un volumen final de 20 µL por tubo. La amplificación para este gen empieza con una desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, luego 35 ciclos de amplificación, lo que conlleva a una desnaturalización de 94 °C durante 30 s, seguido de 54 °C a 30 s para la hibridación de *primer*s y 72 °C por 45 s para la elongación, con una extensión final a 72 °C durante 5 min. Para el caso de las cianobacterias y/o microalgas, no se realizó este proceso.

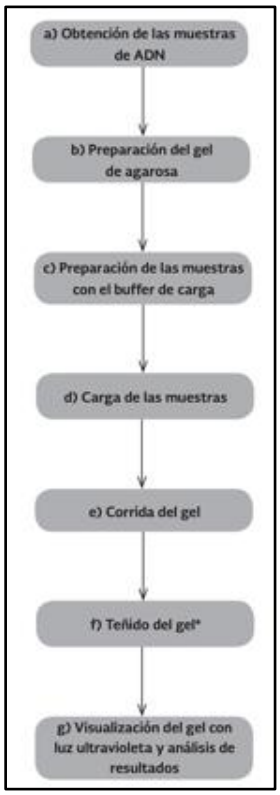
La PCR se empleó solo como prueba de detección para verificar la presencia de los genes; posteriormente, los productos de PCR se enviaron a secuenciar a un laboratorio de Estados Unidos, donde se efectuaron de nuevo las PCR requeridas para el secuenciamiento.

c. Electroforesis

La calidad de los productos de PCR fue verificada mediante migración en un gel de electroforesis de agarosa preparada al 1 %, para ello, se realizó la electroforesis siguiendo los pasos ilustrados en la Figura 7, bajo las siguientes condiciones: Voltios: 90 V; Amperios: 138 mA; Tiempo: 25 min.

Figura 7

Electroforesis



Nota. Tomado de Electroforesis de ADN. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos, 27, por G. Fierro, 2014.

d. Secuenciación por NGS

La secuenciación se realizó en la empresa MRDNA en un secuenciador Illumina MiSeq. El análisis de las secuencias de metabarcoding se realizó utilizando el software propietario de MR DNA (MR DNA, Shallowater, TX, EE. UU.). En resumen, se eliminaron los códigos de barras y los cebadores de las secuencias, se eliminaron las secuencias menores de 150 pb y las secuencias con basecalling ambiguas y Runs de homopolímeros que excedían los 6 pb. Las secuencias fueron “denoised”, se generaron unidades taxonómicas operativas (OTU) y se eliminaron los quimeras. La agrupación definió OTU a un 3% de divergencia (97% de similitud).

e. Análisis bioinformático

Para el análisis de los datos y asignación de taxonomía se realizó con el software bioinformático Qiime 2 (Quantitative Insights Into Microbial Ecology II)

versión 2017.4 (Bolyen *et al*., 2018) (http://qiime2.org). Las secuencias fueron filtradas y se eliminaron quimeras con el plugin q2-dada2 mediante el método denoise-paired, las lecturas forward y reverse fueron truncados a 250 y 150 nucleótidos, respectivamente. Las categorías taxonómicas asignadas a las secuencias representativas se realizaron usando BLASTn contra una base de datos seleccionada derivada de NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) y se compilaron en cada nivel taxonómico en archivos de "recuento" y "porcentaje". Los archivos de conteo contienen el número real de secuencias, mientras que los archivos de porcentaje contienen el porcentaje relativo (proporción) de secuencias dentro de cada muestra que se asignan a la clasificación taxonómica designada.

Actividad 3: Aislamiento selectivo y caracterización de microorganismos de interés

a. Aislamiento de bacterias productoras de biopelícula y hongos

Para el aislamiento de microorganismos se emplearon técnicas microbiológicas clásicas de siembra en placas de agar. Se prepararon 03 medios de cultivo selectivos:

Medio Ashby: es un agar especial libre de nitrógeno que se utiliza para aislar cepas bacterianas capaces de crecer en este medio, cuya característica principal es reemplazar la metabolización del nitrógeno por el nitrógeno atmosférico que está encerrado en el microambiente de una placa Petri (Subba Rao, 1977);

Medio NBRIP: es uno de los más utilizados por su eficiencia en la selección de microorganismos que pueden solubilizar fuentes de fósforo inorgánico (Pi), en el cual se apreciará alrededor de la colonia un halo en el medio circundante que cambia de color a amarillo, atribuida a la producción de ácidos orgánicos por las bacterias objetivo (Liu *et al.*, 2015);

Medio BSK: permite la selección de microorganismos solubilizadores de potasio virando el medio a un color amarillo (Palma & Barcos, 2022).

Estas características son importantes para mejorar las condiciones hostiles del tajo minero. Para ello, las muestras de suelos fueron diluidas en 250 ml de Solución Salina Fisiológica (SSF) e incubadas a 22 °C por 24 - 48 horas. Luego, 100 µL de estas soluciones se inocularon por extensión en placas petri que contienen los medios selectivos. Las muestras restantes (hisopados del tajo, agua colectada) fueron sembradas directamente a los medios de cultivo selectivos, mediante la técnica de estriado. La obtención de colonias puras se realizó mediante purificaciones sucesivas recolectadas directamente de las cepas que crecieron en placa. La verificación de la calidad de estas colonias crecidas individualmente (pureza aparente) se realizó por microscopía.

b. Aislamiento de cianobacterias y/o microalgas

Las cianobacterias y/o microalgas que crecieron en el medio selectivo BG11, bajo las siguientes condiciones: 22 °C de temperatura, sin agitación, la intensidad de luz a 35 mol m^2s^{-1} durante 7 días. Las cianobacterias y/o microalgas se inocularon en medio agar BG11 por la técnica de extensión en placa, así se obtuvieron cultivos monoespecíficos a partir de un solo individuo (célula).

c. Caracterización morfológica de bacterias

Los cultivos puros de bacterias se fijaron en láminas y se teñieron por la técnica de Gram. Posteriormente, se analizaron por microscopía, para interpretar los resultados, se observaron con un aumento de 1000X, utilizándose el aceite de inmersión.

d. Caracterización morfológica de hongos

Los cultivos puros de levaduras se fijaron en la lámina portaobjetos y la tinción se realizó con cristal violeta, mientras que, para la observación de mohos, se utilizó el azul de lactofenol, analizándose por microscopía, la observación se realizó con un aumento de 40X.

e. Caracterización morfológica de cianobacterias y/o microalgas

Los cultivos presuntivamente puros de cianobacterias y/o microalgas se colocaron en fresco en láminas portaobjetos. La observación se realizó por microscopia, con un aumento de 40X.

f. Preservación de cultivos de microorganismos

Para la conservación de bacterias y levaduras, se colectaron 850 µL de los cultivos en caldo Luria-Bertani (LB) en fase exponencial altamente densos y se le añadió 150 µL de glicerol, empleándose como crioprotector, para alcanzar una concentración final del 15 %. Después de mezclar la solución por inversión, los tubos se pre-congelaron a -4 °C durante una hora antes de ser almacenados a -20 °C. Para los mohos, se conservaron en crioviales con medio PDA (Agar papa dextrosa) a -4 °C. Y en el caso de las cianobacterias y/o microalgas, se conservaron en placas con agar BG11 a una temperatura de 20 °C y bajo iluminación LED (luz fría).

Actividad 4: Selección e identificación molecular de los microorganismos de interés

Para la identificación de cultivos puros de bacterias, hongos, cianobacterias y/o microalgas se utilizó el kit de PowerSoil DNA Isolation, siguiendo las instrucciones del fabricante.

a. Amplificación por PCR

Para bacterias, la PCR se llevó a cabo en un tampón de amplificación que consta de un volumen total de 25 ul conteniendo 6.2 ul de agua ultra pura, 5 ul de Buffer 5x, 0.1 ul de Taq polimerasa; 1.5 ul MgCl2 25 mM; 10 mM de dNTPs, 0.6 uL de cada cebador y 1 µL de ADN en suspensión. El proceso de amplificación del gen 16S consta de una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min, luego se lleva a cabo 35 ciclos de amplificación, donde un ciclo conlleva una desnaturalización a 94 °C durante 30 s, seguido de 55 °C por 45 s para la hibridación de cebadores y 72 °C por 90 s para la elongación, con una extensión final a 72 °C durante 6 min.

Para los hongos, se realizó el mismo proceso de amplificación realizado para el respectivo componente metagenómico. Para el caso de las microalgas, no se realizó PCR, solo se cuantificó la cantidad de ADN por nanofotómetro.

b. Electroforesis

Finalizada la PCR, los amplicones fueron observados por electroforesis para ver la calidad de los mismos, comparándose con un marcador de peso molecular y así verificar que los amplicones cumplen con los niveles de pureza y tamaño esperados.

c. Secuenciación de ADN

Los fragmentos de ADN obtenidos mediante amplificación por PCR se enviaron a secuenciar al laboratorio Macrogen mediante la tecnología de secuenciación por Sanger.

d. Identificación de los microorganismos

Las secuencias obtenidas se ensamblaron F y R con los programas META 7 y DNA Dragon. Posteriormente, se compararon con la base de datos de GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) mediante el programa Nucleotide BLAST para su identificación. Se aplicó un filtro basado en un porcentaje mínimo de identidad del 98 %.

Actividad 5: Pruebas de antagonismo

Determinar el antagonismo o la compatibilidad entre las cepas aisladas es crucial, permitiendo la formación de consorcios microbianos eficaces y estables. Por ello, se realizaron pruebas de cada grupo por triplicado. Los ensayos con bacterias se realizaron en medio LB, mientras que para los hongos se desarrollaron en medio PDA. La actividad inhibitoria se evaluó mediante la presencia de halos de inhibición, considerados como resultado positivo. Para el caso con cianobacterias/microalgas, la actividad antagónica de los ensayos posteriores se evaluó por el crecimiento o disminución del número de celulas. Se realizaron ensayos de antagonismo entre los tres grupos microbianos:

Bacterias – hongos filamentosos (HF)

Se sembraron 12 de las 14 bacterias a una densidad óptica (OD) de 1.0. Las cepas L4 y OA3 se inocularon directamente, con un OD de 0.819 y 0.43, respectivamente, agregando 5 µL de cada una sobre medio PDA sin cloranfenicol. En cuanto a los nueve hongos analizados, cinco fueron sembrados mediante la técnica de puntura, mientras que los otros cinco se introdujeron utilizando discos elaborados con sacabocados.

Bacterias - cianobacterias y/o microalgas

Se realizó en microplacas, con un volumen final de 2 ml por pocillo. En cada uno se añadieron 1.8 ml de medio BG11 y 200 µL de cada cianobacteria/microalga (10 % del volumen total). Las bacterias, se ajustadas a una OD de 1.0, se mezclaron para formar consorcios y se inocularon con 2 µL por pocillo (0.1 % del volumen total).

Hongos filamentosos (HF) - cianobacterias/microalgas

Se realizó en microplacas de 300 µL, utilizando un volumen final de 150 µL. Se agregaron 135 µL de medio BG11 y 15 µL de cada cianobacteria/microalga. Posteriormente, se vortexó el medio PDB que contenía las esporas de hongos, las cuales fueron contabilizadas (Anexo 2) y se inocularon 10 µL de cada hongo en los pocillos correspondientes. La lectura de los resultados se realizó utilizando una cámara de Neubauer.

Todos los ensayos se incubaron a 16 °C durante 8 días.

Actividad 6: Formación de *biofilm* de bacterias y levaduras para la formulación de consorcios

Para el análisis cualitativo de formación de *biofilm* se aplicó la metodología de Koczan (2009) para la evaluación cualitativa de la formación de *biofilm* en bacterias y levaduras:

Esta técnica consiste en utilizar una alícuota de 5 ml de células cultivadas durante la noche en LB a 28ºC. Se inocularon en 125 ml de LB estéril (caldo Luria, Merck) en 96 pozos individuales (placa de PVC) cada una de las cuales recibe un aislado de bacteria o levadura) y se incubaron a 28 ºC durante 16 h con mínima agitación.

Después del crecimiento de bacterias y levaduras, se descartó el medio y se llenaron los pozos con 10 % de tinción de cristal violeta. Después de 1 h a temperatura ambiente, se elimina el exceso del colorante mediante ligeros lavados de los pocillos. Se determinó visualmente la presencia de anillos teñidos por el cristal violeta, el cual es retenido por el *biofilm* en las paredes del pozo. La evaluación de la formación de *biofilm*s se repitió tres veces.

Para el caso de mohos, cianobacterias y/o microalgas, no fue necesario este análisis, sino mediante la observación macroscópica de su crecimiento.

Actividad 7: Masificación de microorganismos de los consorcios seleccionados para roca

a. Masificación de bacterias y hongos

Se utilizó melaza como medio de cultivo para determinar la concentración óptima (2.5 %, 5 % y 7 %) que favorece el crecimiento de bacterias y hongos. Las bacterias fueron sometidas a dos temperaturas (20 °C y 30 °C) y su crecimiento se monitoreó durante 72 horas mediante mediciones de densidad óptica (OD) a 600 nm, utilizando un nanofotómetro. Las concentraciones iniciales bacterianas fueron de 10^8 y 10^9 UFC mL^{-1}.

Para los hongos, se evaluó a partir de esporas en el medio propuesto. Se utilizó la cámara de Neubauer para el conteo celular, con una mezcla inicial de 200 µL de solución de esporas y 800 µL de la dilución de melaza por pocillo.

La melaza, subproducto de la caña de azúcar o remolacha, es rica en azúcares, minerales y otros nutrientes, lo que la convierte en una fuente de carbono ideal para el desarrollo microbiano (Lagos & Castro, 2019). El

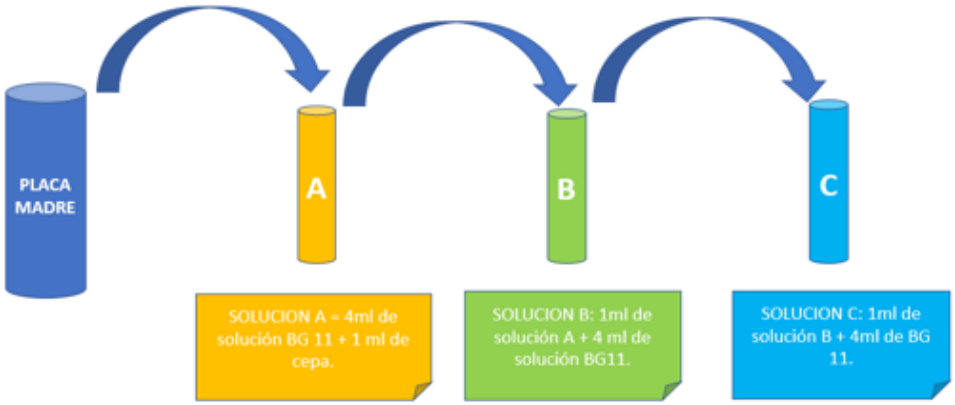
objetivo de este ensayo fue identificar la concentración más adecuada de melaza para promover el crecimiento eficiente de los microorganismos.

b. Masificación de cianobacterias y/o microalgas

Se realizaron diluciones seriadas de las placas madres en tubos rotulados como A, B y C (Figura 8). Tras un mes de incubación, se evaluó la presencia de crecimiento en las paredes de los tubos o la formación de biopelículas adheridas al medio, permitiendo así la creación de un cepario. Durante la revisión, se registraron características morfológicas y funcionales como el color, la forma, la cantidad de células, la movilidad y la presencia o ausencia de protozoarios.

Figura 8

Proceso de diluciones seriales a partir de las placas madres de cianobacterias y/o microalgas



Posteriormente, se procedió con la masificación de las cepas de cianobacterias y/o microalgas aptas para el proceso (Figura 9).

Figura 9

Masificación de cianobacterias y/o microalgas a 100 ml



Actividad 8: Ensayo de colonización de microorganismos formadores de *biofilm*s a pequeña escala en el laboratorio

a. Colonización de bacterias, hongos, cianobacterias y/o microalgas en rocas

Para la preparación de los inóculos bacterianos, se cultivaron 500 mL de cada cepa en caldo LB y se ajustaron a una densidad óptica (OD) de 1,0. En el caso de los hongos, estos fueron cultivados durante 7 días en medio PDB y posteriormente homogeneizados en su propio medio.

Para los ensayos, se utilizaron fragmentos de roca triturada de aproximadamente 5 cm de longitud, colocadas en tarrinas plásticas de un cuarto de capacidad. Inicialmente, se midió el pH de las rocas lavándolas (sin inóculo) con 15 mL de agua destilada, permitiendo el drenaje del líquido durante 4 horas en un recipiente situado debajo de cada tarrina.

Posteriormente, se aplicaron los inóculos de bacterias, cianobacterias/microalgas y hongos directamente sobre las rocas, completando un volumen final de 15 mL por tarrina. Cada tratamiento se realizó por triplicado, incluyendo controles que consistieron en un medio sin inóculo. Tras un periodo de 10 días, se repitió el lavado para medir el pH final de las rocas.

Adicionalmente, se realizó un segundo ensayo empleando únicamente cepas bacterianas, manteniéndose sin cambios el resto del protocolo experimental. Los inóculos fueron masificados utilizando melaza al 2 % (peso /volumen), con 48 horas de incubación a temperatura ambiente en un agitador shaker. Cada siembra se ha manejado por triplicado con sus respectivos controles Melaza al 2%.

b. Colonización de cianobacterias y/o microalgas en diferentes sustratos y en rocas de gran tamaño

Se llevó a cabo un bioensayo utilizando cepas previamente seleccionadas, las cuales fueron masificadas en un volumen de 500 ml de medio BG11 e incubadas a 20 °C (Figura 10).

Figura 10

Cepas seleccionadas para el bioensayo



Se emplearon tres tipos de materiales como sustrato: vidrio (superficie lisa), cerámica (superficie semilisa) y roca (superficie rugosa), todos con un tamaño aproximado de 5 cm (Figura 11). Las muestras fueron colocadas en tarrinas de un cuarto de capacidad, realizándose el experimento por triplicado y distribuyéndose en dos grupos experimentales. En el primero se utilizó únicamente el medio BG11, que ya contiene el microorganismo, mientras que en el segundo se empleó una mezcla de BG11 con melaza al 2.5 %. Entre el primer y segundo rociado transcurrieron 11 días, período durante el cual se aplicaron 5 ml adicionales.

Figura 11

Superficies utilizadas para el bioensayo



Paralelamente, se desarrolló un segundo ensayo por triplicado utilizando rocas de aproximadamente 20 cm, que actuaron como sustrato inerte para facilitar la adhesión y el crecimiento de los microorganismos, así como la formación de comunidades estructuradas. Estas rocas, de composición controlada, fueron previamente esterilizadas. En este caso, se evaluaron cuatro tipos de soportes: dos con base sólida para reducir la evaporación del medio (gelatina incolora + BG11 y agar al 2 % + BG11) y dos combinaciones con melaza como fuente de carbono (melaza al 2.5 % + BG11 y melaza al 1.5 % + agua destilada).

La inoculación en todas las rocas, se realizó con un aspersor de medio litro, empleando una única cepa seleccionada por su rápido crecimiento. Se incluyó como control la inoculación del microorganismo sin ningún tipo de soporte. Las muestras fueron incubadas a 20 °C bajo condiciones de luz continua durante 24 horas. El crecimiento sobre la superficie de las rocas fue monitoreado diariamente de manera visual durante dos semanas (Figura 12).

Al finalizar el ensayo, las rocas se lavaron con agua destilada estéril, se recolectó una alícuota del sobrenadante y se analizaron las muestras mediante microscopía, utilizando la cámara de Neubauer.

Figura 12

Rocas de mayor tamaño utilizadas en el bioensayo



Actividad 9: Sucesión ecológica

Ensayo de crecimiento de hongos y microalgas en rocas

Se seleccionaron tres cepas de microalgas: cepa 3 (Prístino), cepa 4 (TSP #6) y cepa 11 (planta silvestre), debido a su alta capacidad para generar *biofilm* en un corto periodo. Para el cultivo de hongos filamentosos (HF), se empleó caldo de papa con dextrosa (PDB), incubándolos durante 6 días. En esta etapa no se realizó el conteo de esporas; en su lugar, se observaron las hifas mediante microscopía.

En el primer grupo experimental, la inoculación de los microorganismos se realizó en el siguiente orden:

1° Microalgas: fueron inoculadas utilizando un atomizador manual, aplicando 3 rociadas sobre la superficie de las rocas. Se realizaron refuerzos en los días 2 y 9 posteriores a la inoculación inicial.

2° Hongos filamentosos: fueron inoculados 5 días después de la aplicación de las microalgas. Se introdujeron aproximadamente 1 ml de cada cepa de HF utilizando micropipetas de 1000 µl con las puntas previamente cortadas para facilitar la succión del micelio.

El segundo grupo, el orden de inoculación fue inverso:

1° Hongos filamentosos: se inocularon siguiendo el protocolo del grupo anterior.

2° Microalgas: fueron aplicadas 2 días después de la inoculación de los hongos, utilizando atomizadores pequeños y rociando entre 3 veces sobre la superficie de las rocas.

Ambos tipos de microorganismos fueron cultivados con el objetivo de producir y formar propio *biofilm* sobre las rocas. Se monitoreó su crecimiento o inhibición semanalmente mediante observación macroscópica del aspecto de las rocas durante un periodo de 88 días (Anexo 3).

Posteriormente, se llevó a cabo un ensayo a temperatura ambiente para evaluar la acidez del agua drenante de las rocas, centrándose en los tratamientos que presentaron mayor desarrollo de hongos filamentosos (Tabla 1). Se tomaron tres tipos de controles: solo la piedra lavada; solo el medio de cultivo BG11 sobre la roca, a las 73 horas después de agregarse 50 ml de agua destilada y el tercer control fue solo la microalga respectiva. La medición del pH del drenaje se realizó utilizando un pHmetro Hanna HI98103 (Figura 13).

Tabla 1

Evaluación del pH en diferentes tratamientos de microalgas y hongos

1° Microalga 2° Hongos		1° Hongos 2° Microalga		1° Microalga 2° Hongos		1° Hongos 2° Microalga	
MICROALGA 3	H1	H1	MICROALGA 3	MICROALGA 11	H2	H2	MICROALGA 11
	H5	H5			H3	H3	
	H8	H8			H5	H5	
	H9	H9			H7	H7	
					H8	H8	

Figura 13

Pasos de medición del pH



Ensayo sucesión de hongos, cianobacterias/microalgas y bacterias

Se seleccionaron los inóculos bacterianos y fúngicos más eficaces de los ensayos previos. Las bacterias fueron reactivadas en medio LB, añadiendo 100 µL del inóculo a 900 µL de medio, incubándolas a temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente, se masificaron en melaza al 2 % (concentración óptima), utilizando un volumen final de 30 ml.

Cada cultivo masificado (30 ml) fue transferido a 500 ml de melaza, junto con sus respectivos controles. La inoculación fúngica se realizó bajo condiciones estériles con ayuda de un mechero, raspando la superficie más joven del micelio. La incubación de ambos tipos de microorganismos se llevó a cabo en agitación continua a temperatura ambiente durante 48 horas.

La aplicación de los consorcios sobre rocas extraídas del tajo minero se realizó una vez evaluado el crecimiento microbiano. Las bacterias fueron cuantificadas por espectrofotometría, mientras que para los hongos y cianobaterias/microalgas se utilizó mediante recuento en cámara de neubauer.

Previo a la inoculación, las rocas fueron lavadas con agua destilada estéril, registrándose el pH inicial de cada una. Posteriormente, se aplicaron los tratamientos directamente sobre toda la superficie de las rocas, utilizando un volumen estándar de 15 ml por roca (Tabla 2). Todos los tratamientos se realizaron por triplicado.

Para el tratamiento 1, se prepararon 100 g de topsoil, humedecido con 4 ml de un consorcio propuesto (L1, OB2, OA2, OP1, UA3) y 16 ml de agua destilada. Esta mezcla se aplicó sobre la superficie de las rocas. Después de 10 días de la aplicación del barro, se sembraron cuatro semillas de trébol por roca, humectándose según la necesidad, las cuales germinaron en un plazo de 5 días. En este tratamiento no se realizaron lavados hasta el final del ensayo.

Para los tratamientos 2 al 8, los microorganismos fueron aplicados de forma secuencial los días 4, 12 y 17.

Para los tratamientos 9 al 11 se agregaron 11 ml de los microorganismos en cada caso. Mientras que en el Tratamiento 12 se aplicaron 11 ml en total de un consorcio bacteriano (OP1 y UA3).

El pH del agua reposada en contacto con los microorganismos se monitoreó diariamente durante un periodo de 18 días.

Tabla 2

Tratamientos para impermeabilización y mejoramiento de pH

N°	Descripción
T1	Suelo + m.o (L1, OB2, OA2, OP1, UA3) + semillas de trebol
T2	Sucesión 1: Microalga 4 + Hongo 8 + UA3
T3	Sucesión 2: Microalga 4+ Hongo 2 + UA3
T4	Sucesión 3: Microalga 11 + Hongo 3 + UA3
T5	Sucesión 4: Microalga 11 + Hongo 5 + UA3
T6	Sucesión 5: Microalga 4 + Hongo 6 + UA3
T7	Sucesión 6: Microalga 11 + Hongo 1 + UA3
T8	Sucesión 7: Hongo 5+ Microalga 3 + UA3
T9	Microalga 11
T10	Cianobacteria/microalga 15
T11	Bacteria L4
T12	Consorcio de bact. formadoras de *biofilm* (OP1, UA3)
T13	Bioaumentación (melaza 2 %)
T14	Control: Agua de bramadero sin esterilizar

Actividad 10: Procesamiento y análisis de datos

Las tablas y representaciones gráficas de los datos fueron elaboradas utilizando hojas de cálculo de Microsoft Excel. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett, estableciendo un nivel de significancia del 5 % ($p < 0.05$) y un intervalo de confianza del 95 %.

IV. Resultados y discusión

4.1. Caracterización metagenómica de las comunidades microbianas estudiadas

Datos de secuenciación

El proceso de secuenciación de la región V4 generó un total de 382,766 secuencias sin procesar (Tabla 3). Luego de aplicar un riguroso procedimiento de filtrado, se obtuvieron 293,123 secuencias de alta calidad y adecuadamente curadas, lo que representa el 70.5 % del total. En cuanto a la región ITS1-2, se registraron 668,176 secuencias sin procesar, de las cuales, después de aplicar la filtración, se obtuvieron 338,165 secuencias curadas, correspondientes al 50.6 %. La mayoría de estas secuencias filtradas provinieron de las muestras de topsoil TSD, TSC, TST y WP, permitiendo así la identificación de 2,832 unidades taxonómicas operativas (OTUs) bacterianas y 1,519 OTUs fúngicas, utilizando un umbral de identidad superior al 97 %.

Johnson *et al.* (2019) destacan que el gen ARNr 16S ha sido una herramienta fundamental para el análisis bacteriano basado en secuencias durante varias décadas. Sus hallazgos evidencian que la segmentación de las regiones variables del gen 16S, mediante plataformas de secuenciación de lectura corta, no alcanza la resolución taxonómica que se logra al secuenciar el gen completo, el cual abarca aproximadamente 1500 pares de bases.

Por su parte, Mbareche *et al*. (2020) señalan que sus resultados indican claramente un mejor desempeño del marcador ITS1 en comparación con ITS2, en términos de riqueza y cobertura taxonómica. Si bien se ha demostrado que ciertos taxones son detectados exclusivamente por ITS2 y otros únicamente por ITS1, ninguno de estos códigos de barras resulta completamente eficaz para distinguir todas las especies. No obstante, el uso combinado de ambos

permite obtener una visión más completa de la comunidad fúngica. En consecuencia, los autores recomiendan el uso de ITS1 como código de barras fúngico universal para análisis rápidos de diversidad, especialmente en contextos con recursos financieros limitados, debido a su capacidad para generar perfiles taxonómicos comparables a los obtenidos con estrategias más completas.

Tabla 3

Número de secuencias crudas y filtradas utilizadas para el análisis metagenómico dirigido al gen ARNr 16S y al gen ARNr ITS

	Bacteria			Hongo		
ID de muestra	**Lecturas sin procesar**	**Lecturas filtradas**	**% lecturas filtradas**	**Lecturas sin procesar**	**Lecturas filtradas**	**% lecturas filtradas**
PSP	34,821	23,653	67.9 %	36,383	31,356	86.2 %
TCP	34,783	24,816	71.3 %	73,722	32,985	44.7 %
TCZ	34,793	27,162	78.1 %	70,875	33,432	47.2 %
TST	34,784	23,296	67.0 %	103,681	26,674	25.7 %
TSC	34,802	22,461	64.5 %	88,274	28,264	32.0 %
TSD	34,773	21,320	61.3 %	70,389	30,652	43.5 %
HR	34,800	30,612	88.0 %	42,524	34,727	81.7 %
GP	34,786	33,806	97.2 %	57,666	34,557	59.9 %
POW	34,811	26,506	76.1 %	25,142	21,768	86.6 %
POD	34,796	30,026	86.3 %	40,227	33,896	84.3 %
WP	34,817	29,465	84.6 %	59,283	29,854	50.4 %
Total	382,766	293,123	-	668,176	338,165	-
Promedio	34,797	26,648	70.5 %	60,742	30,742	50.6 %

Metagenómica de bacterias

Se realizó un análisis de la microbiota bacteriana en distintos tipos de suelo: suelo prístino (PSP), suelos provenientes de áreas de almacenamiento (TSD, TSO, TSC), tecnosuelo maduro listo para su uso (TCZ) y tecnosuelo revegetado tras ocho meses de aplicación (TCP). En estas muestras se identificó una comunidad bacteriana compuesta por 23 filos, que agrupan un total de 415 géneros. Cabe resaltar que los tecnosuelos (TCZ y TCP) presentaron el menor número de filos, sin embargo, exhibieron la mayor diversidad bacteriana en términos de géneros. En contraste, el suelo prístino registró la menor cantidad de géneros a pesar de mostrar un número de filos superior al de los tecnosuelos.

Adicionalmente, se evaluó la diversidad bacteriana presente en tajos (POD, POW, GP), así como en el agua de escorrentía del tajo San Pedro (POW) y en un tajo cercano a la vía de tránsito de vehículos de transporte (HR) perteneciente a la operación minera La Zanja. En total, la diversidad bacteriana en estos tajos incluyó 13 filos que albergan 169 géneros distintos. La mayor diversidad de géneros se observó en el tajo naranja húmedo, con un total de 73, mientras que la menor se registró en la muestra HP, con 45 géneros (ver Tabla 4).

Tabla 4

Número de OTU bacterianas en muestras de suelos y tajos

Muestra	Filo	Total	Género	Total
Número de OTU's bacterianos en suelos				
PSP	20	23	199	415
TSD	22		264	
TSO	19		242	
TSC	21		229	
TCZ	16		282	
TCP	18		291	
Media	**19.3**		**251.2**	
Número de OTU's bacterianos en tajos				
POD	6	13	48	169
POW	7		73	
GP	10		60	
HR	6		45	
WP	11		66	
Media	**8**		**58.4**	

El análisis filogenético de las comunidades bacterianas del suelo, que se muestra en la Figura 14A, reveló un predominio notable de los filos *Proteobacteria* (39,9 % en promedio) y *Acidobacteria* (19,8 %) en la mayoría de las muestras analizadas. También se observaron prevalencias significativas de *Bacteroidetes* (13,6 %) y *Actinobacteria* (7,9 %). Es destacable la similitud en los perfiles bacterianos entre los suelos prístinos y los topsoils. No obstante, el tecnosuelo La Zanja (TCZ) presentó un perfil marcadamente distinto, mientras

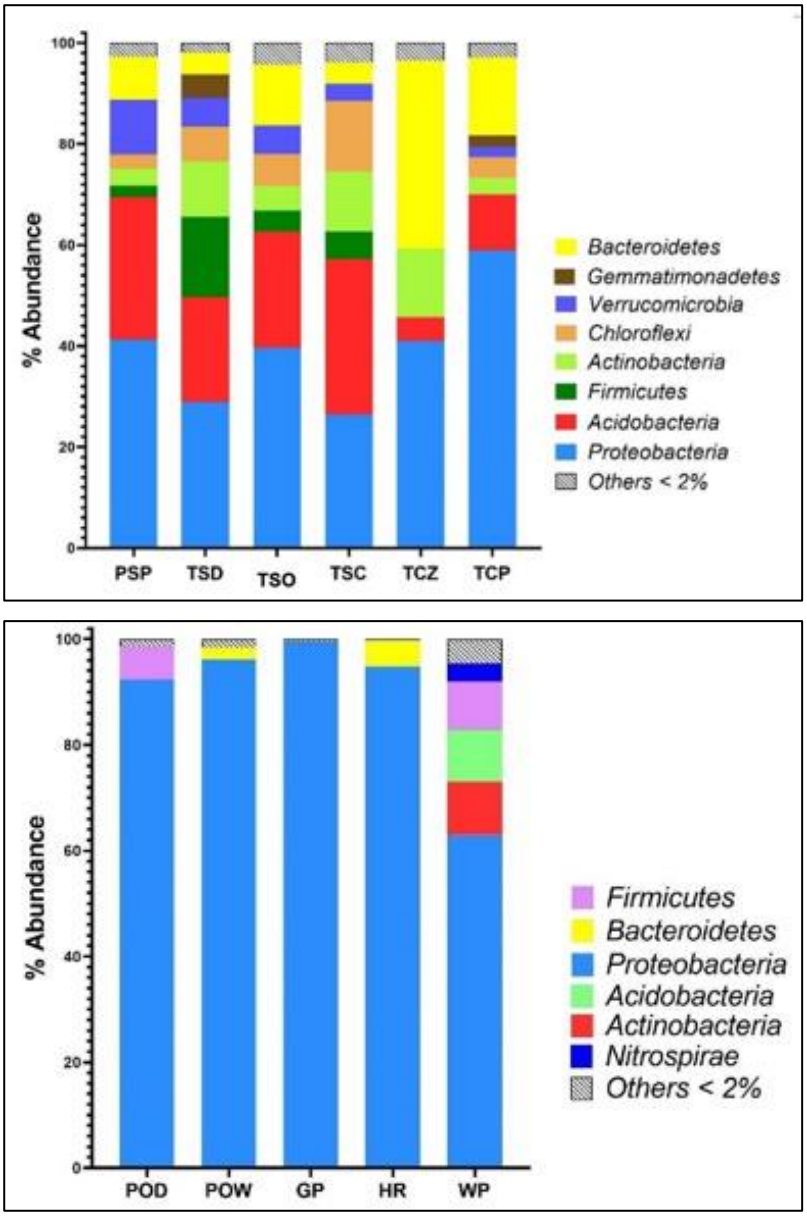
que el tecnosuelo revegetado (TCP) mostró un perfil intermedio entre los suelos naturales y el tecnosuelo sin revegetar (TCZ).

Estos datos coincidieron con investigaciones previas, que identificaron a *Proteobacteria*, *Acidobacteria* y *Actinobacteria* como tres de los cuatro filos bacterianos más predominantes en ambientes mineros (Chávez, 2024). Además, se ha documentado que *Actinobacteria* y *Gammaproteobacteria* son los grupos mejor adaptados a suelos ácidos impactados por la minería aurífera (Gagnon, *et al.* 2020).

Para las bacterias presentes en los tajos, el análisis filogenético reveló un claro predominio del filo *Proteobacteria* en todas las muestras, con proporciones que oscilaron entre el 62,9 % y el 99,5 %. Le siguen los *Firmicutes*, detectados con un 9,3 % en la muestra de agua (WP) y un 6,2 % en la muestra de la pared naranja seca (POD). Además, se identificó un 10,2 % de *Actinobacteria* en WP, mientras que *Bacteroidetes* estuvieron presentes en un 4,9 % en HR y en un 2,2 % en POW (Figura 14B). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Rodríguez, *et al.* (2022), quien evidenció a *Proteobacteria* y *Firmicutes* como los filos más representativos en comunidades bacterianas de suelos y aguas asociadas a la minería artesanal.

Figura 14

Abundancia relativa de filos bacterianos. A. Suelos. B. Tajos



Para la diversidad de géneros bacterianos en suelos (Figura 15A), se observa una destacada prevalencia del género *Acidobacterium* en todas las muestras, con excepción de TCZ. En los suelos prístinos y los topsoils se registraron altas abundancias de *Nitrosovibrio* (10,9 %) y *Holophaga* (6,7 %), mientras que en los tecnosuelos su presencia disminuyó drásticamente a 1,0 % y 0,1 %, respectivamente. Las comunidades bacterianas que habitan estos ambientes extremos están compuestas principalmente por bacterias quimiolitótrofo autótrofo nitrificantes, como *Nitrosovibrio*, y por microorganismos capaces de

producir compuestos volátiles de azufre, como *Holophaga* (Koops & Pommerening, 2015; Anderson, *et al*. 2012).

Asimismo, se identificaron otros géneros presentes en menor proporción en los topsoils y suelos prístinos, siendo prácticamente ausentes en los tecnosuelos, tales como *Pedospharea*, *Candidatus Koribacter*, *Steroidobacter*, *Rhodothermus*, *Candidatus Solibacter*, *Prosthecobacter* y *Bradyrhizobium*. Entre los géneros más comunes en los topsoils también destacan *Ktedonobacter*, *Thermoflavimicrobium* y *Methylobacter*.

En contraste, los géneros *Bacteroides* y *Acidovorax* fueron más frecuentes en los tecnosuelos, con promedios del 3,0 % y 2,9 %, respectivamente, mientras que su prevalencia en los topsoils fue mínima (0,3 % y <0,1 %). *Bacteroides* forma parte del microbiota gastrointestinal de mamíferos y de suelos vegetados, mientras que *Acidovorax*, cuyo nombre hace referencia a la degradación ácida vinculada a la reducción de nitratos (Diebold *et al*., 2023, Willems & Gillis, 2015), siendo ambos géneros poco comunes en suelos naturales.

Cabe resaltar que *Flavihumibacter* presentó elevada abundancia en la muestra TCZ (14,6 %), pero fue casi inexistente en las demás. Por otro lado, el tecnosuelo revegetado (TCP) evidenció una alta diversidad de géneros dominantes, entre los que se destacaron *Thiobacillus*, que utiliza compuestos de azufre como fuente energética; *Anaeromyxobacter*, con capacidad fijadora de nitrógeno; *Geobacter*, reconocido por su utilidad en procesos de biorremediación, siendo los primeros organismos hallados con la capacidad de oxidar compuestos orgánicos y metales; *Geothrix*, con capacidad para reducir metales (Li *et al*., 2023; Han *et al*., 2023; Gu *et al*., 2023).

La microbiota bacteriana en los tajos estuvo dominada principalmente por los géneros *Burkholderia* (29,3 %) y *Pseudomonas* (27,5 %), seguidos por *Serratia* (7,7 %). En los tajos grises, *Burkholderia* llegó a representar hasta el 94,6 % de la comunidad bacteriana. Este género corresponde a bacterias saprófitas con una notable capacidad para degradar contaminantes orgánicos; algunas cepas pueden actuar como patógenos oportunistas y otras han demostrado resistencia a metales pesados (González & Patiño, 2022; Ye *et al*., 2023).

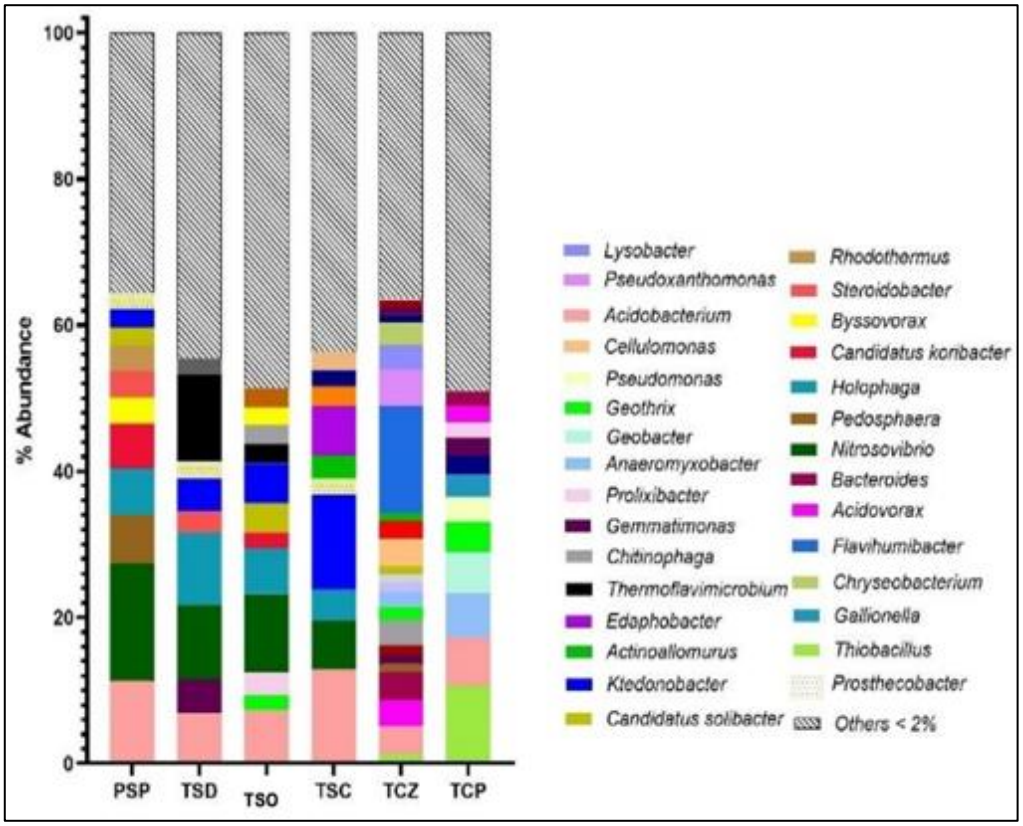
Por su parte, *Pseudomonas* fue el género predominante en las muestras de los tajos naranjas (POD y POW) y en HR. Se trata de un género ubicuo con gran plasticidad metabólica, lo que le permite colonizar una amplia variedad de nichos, incluidos aquellos ecosistemas afectados por la contaminación. Su resistencia a metales pesados y otros compuestos tóxicos la convierte en una candidata clave para la biorremediación. Estudios recientes han evidenciado su predominio en sistemas que combinan pirita con fuentes de carbono (Madigan *et al*., 2005; Mayta *et al*., 2023; Xu *et al*., 2022).

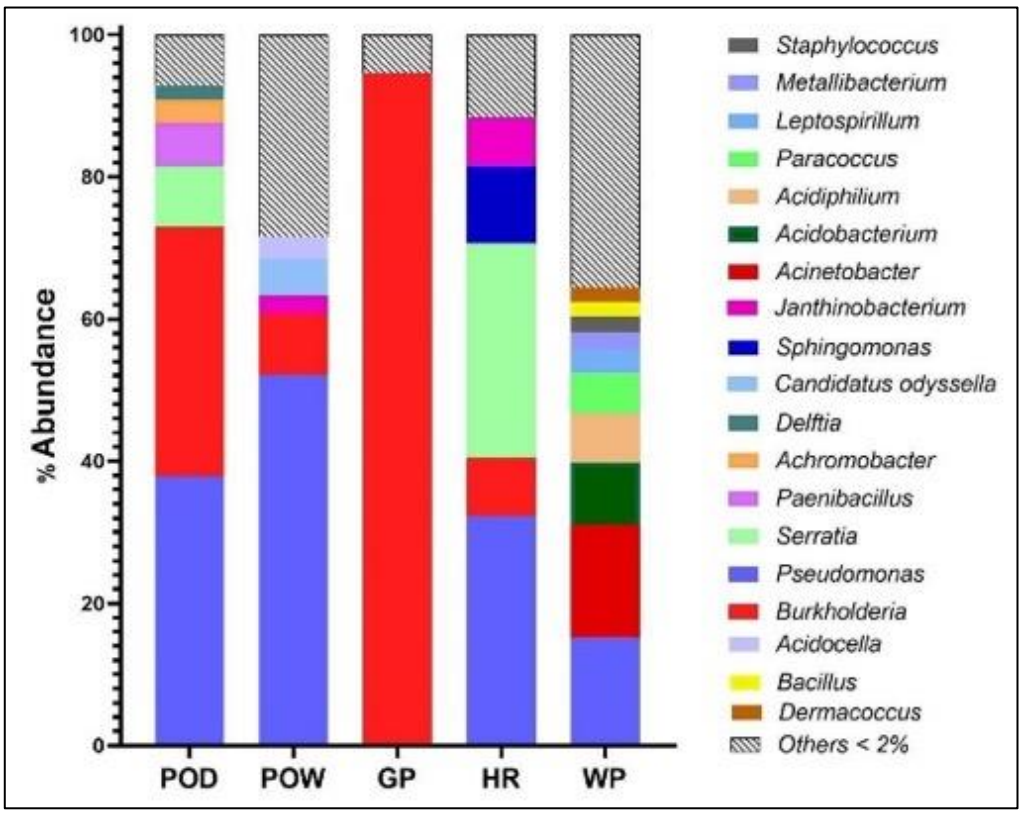
En los tajos situados a lo largo de la vía de tránsito vehicular (HR), el género *Serratia* alcanzó una alta prevalencia (30,2 %). Esta especie ubicua coloniza diversos ambientes, en agua, suelo, plantas, animales e incluso alimentos, especialmente aquellos ricos en carbono. Algunas cepas encontradas en relaves mineros han demostrado la capacidad de utilizar metales pesados para facilitar la fijación de nitrógeno (Li *et al*., 2022).

Finalmente, la microbiota de la escorrentía (WP) presentó una diversidad considerablemente mayor que las demás muestras, destacando la presencia de *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Rhodanobacter*, mientras que *Burkholderia* estuvo ausente (Figura 15B). *Acinetobacter* es un género ampliamente distribuido en la naturaleza, con un papel importante en la mineralización del suelo (García *et al*., 2021). Por su parte, *Rhodanobacter* comprende bacterias desnitrificantes con alta tolerancia a ambientes ácidos (Prakash *et al*., 2021).

Figura 15

Abundancia relativa de géneros bacterianos. A. Suelos. B. Tajos





Metagenómica de hongos

El análisis mediante secuenciación de la región ITS en las muestras de suelo reveló la presencia de entre 7 y 9 filos por muestra, alcanzando un total de 11 filos, que abarcaron 368 géneros distintos. En comparación con la microbiota bacteriana, la diversidad fúngica fue considerablemente menor en los tecnosuelos.

En las muestras de los tajos, se detectó un número reducido de filos (9 en total), identificándose un total de 293 géneros fúngicos. Esta cifra contrastó con los resultados obtenidos mediante el análisis de la región 16S rRNA, en el que se registraron 13 filos y 169 géneros. La muestra correspondiente al agua de escorrentía (WP) presentó la mayor riqueza de géneros fúngicos, seguida por las muestras de la pared naranja seca (POD) y la pared gris (PG) (Tabla 5).

Tabla 5

Número de OTU fúngicas en muestras de suelo y tajos

Muestra	Filo	Total	Género	Total
Número de OTU's fúngicos en suelos				
PSP	8	11	228	368
TSD	9		238	
TSO	7		216	
TSC	9		210	
TCZ	7		201	
TCP	9		187	
Media	**8.1**		**213.3**	
Número de OTU's fúngicos en tajos				
POD	8	9	177	293
POW	8		139	
GP	8		169	
HR	5		168	
WP	8		228	
Media	**7.4**		**176.2**	

Desde una perspectiva filogenética, los suelos prístinos y los topsoils están dominados por el filo *Ascomycota*, que representa el 61,4 % de la comunidad fúngica, seguido por *Basidiomycota* (15,7 %) y *Mucoromycota* (13,1 %). En

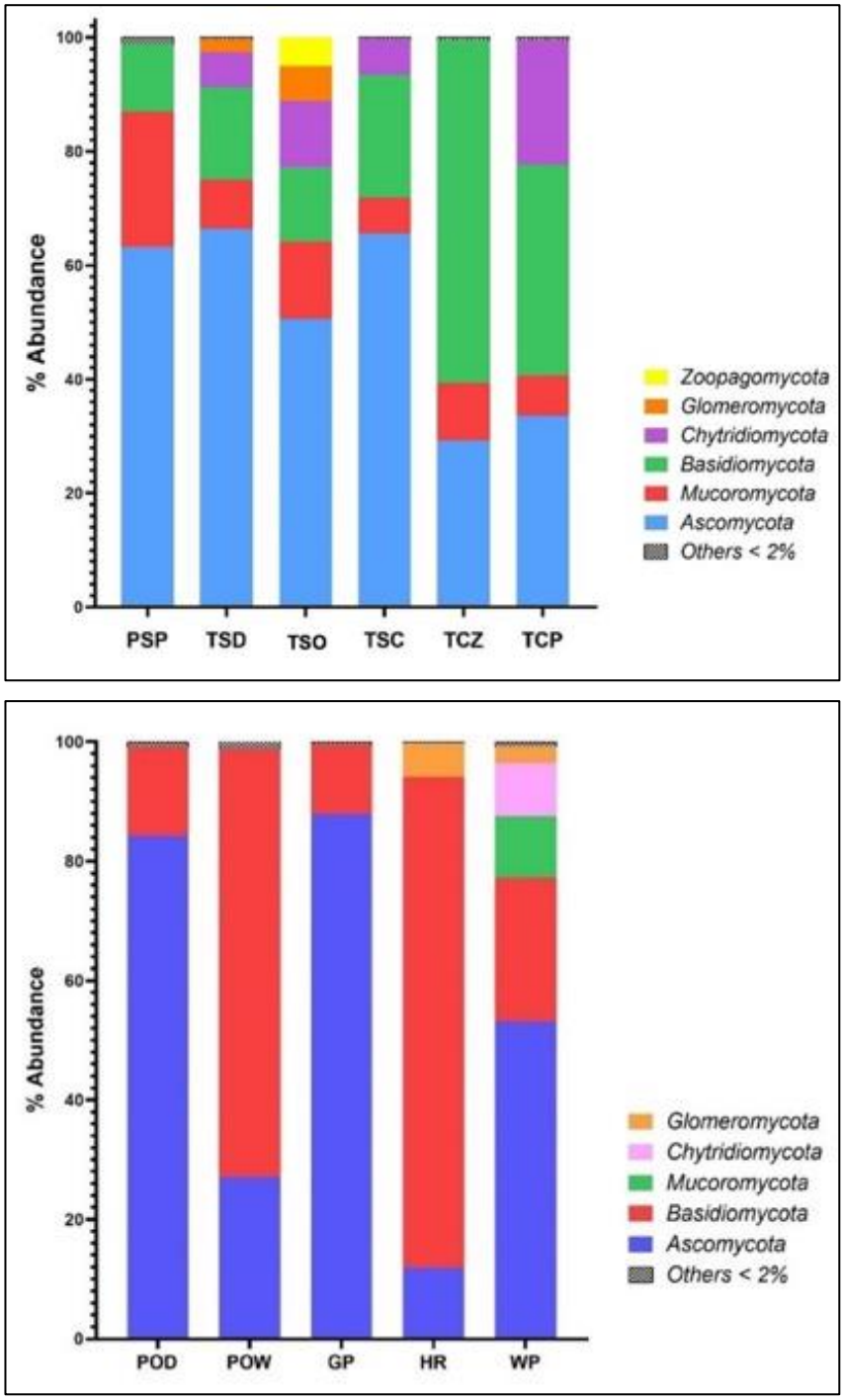
contraste, los tecnosuelos —recientemente preparados o revegetados— presentan una marcada predominancia de *Basidiomycota* (48,6 %) y un menor porcentaje de *Ascomycota* (31,4 %) (Figura 16A).

En los tajos, el análisis filogenético reveló que los filos dominantes fueron *Ascomycota* (52,9 %) y *Basidiomycota* (40,9 %), aunque su prevalencia varió entre las diferentes muestras. Específicamente, la muestra correspondiente al agua de escorrentía (WP) fue la única en la que se detectó la presencia de *Mucoromycota* y *Chytridiomycota*, además de una baja representación de *Glomeromycota* en comparación con la muestra de HR (Figura 16B).

Existen pocos estudios centrados en la estructura de comunidades fúngicas en entornos impactados por actividades mineras. En un estudio realizado por Singh & Narzary (2023) en relaves de minas de carbón, que estos ambientes estaban mayormente dominados por los filos *Basidiomycota* y *Ascomycota*. Por su parte, Sansupa *et al*. (2022) analizaron comunidades fúngicas en suelos de canteras de piedra caliza, suelos rehabilitados y bosques aledaños, encontrando predominancia de *Ascomycota*, seguido de *Basidiomycota*, mientras que *Mucoromycota* se halló exclusivamente en los suelos del bosque. De manera similar, Figueiredo *et al.* (2023) compararon comunidades fúngicas entre pastizales conservados y aquellos degradados por minería de bauxita en Brasil, encontrando que *Basidiomycota* y *Ascomycota* era predominantes, siendo este último el más abundante en las zonas degradadas.

Figura 16

Abundancia relativa de filos fúngicos. A. Suelos. B. Tajos



En las muestras de suelos prístinos se observó una amplia variedad de géneros fúngicos, aunque la mayoría se presentaron en proporciones inferiores al 2 %, en contraste con lo registrado en los tecnosuelos. *Mortierella* se destacó como el género más común en todas las muestras, siendo el único que superó el 1 % en cada tipo de suelo analizado. Entre los géneros saprófitos predominantes

en el suelo prístino se encuentran *Archaeorhizomyces*, asociado al crecimiento en el suelo y alrededor de las raíces; *Mortierella*, que forma parte de un grupo ecológico importante al ser de los primeros organismos en colonizar las raíces; y *Sphaerosporella*, que suele encontrarse entre musgos y sobre suelos desnudos (Pinto *et al*., 2019; Ozimek & Hanaka, 2020; Kuo, 2015).

En los tecnosuelos, las capas superficiales TSD, TSO y TSC presentaron una diversidad relativa de géneros. No obstante, en las capas TCZ y TCP se observó una notable dominancia del género *Coprinellus*, que alcanzó un 30,8 %. Este hongo ligninolítico ha sido ampliamente asociado con la degradación de la madera, especialmente de especies como el pino (Oliver, 2008), que constituye uno de los componentes de los tecnosuelos (Figura 17A).

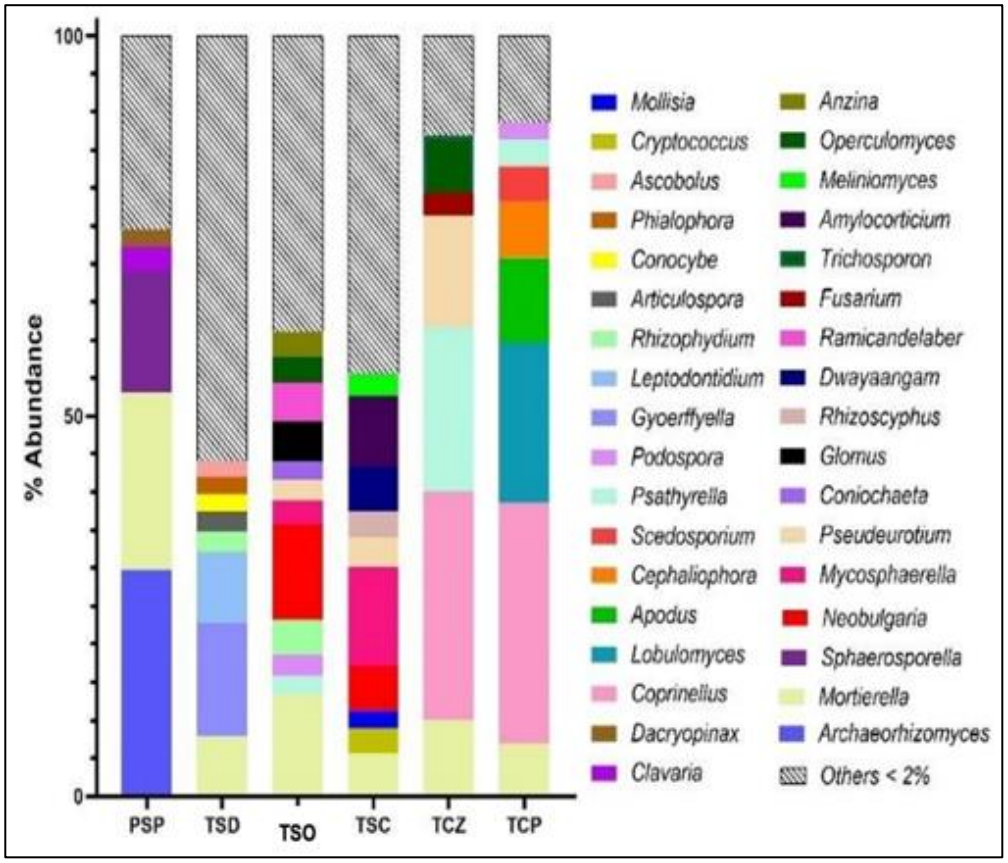
En tajos, cada muestra presentó un perfil fúngico distintivo, con géneros predominantes específicos. En la muestra HR, *Microbotryozyma* alcanzó un 72,3 %; este género corresponde a una levadura aislada del intestino de un chinche de plantas *Collaria oleosa* (Suh *et al*., 2012), probablemente presente por la influencia de la flora circundante. En la muestra GP, predominó *Aureobasidium* con un 40,3 %, un hongo conocido por su capacidad para sintetizar enzimas que permiten la utilización de una amplia gama de sustratos, incluyendo diversos desechos (Wang *et al*., 2022) y en este caso, se trata de una superficie altamente ácida y con una alteración argílica avanzada.

En la muestra POW, *Leucosporidiella* alcanzó una representación del 42,2 %. La muestra POD presentó una elevada abundancia de *Alatospora* (41,7 %), un hifomiceto acuático clave en la descomposición de materia orgánica en ambientes lóticos, y *Volutella* (20,2 %), un hongo fitopatógeno (Péñate *et al*., 2021; Yang *et al*., 2022). Por último, la muestra WP mostró una mayor diversidad fúngica, donde los géneros dominantes fueron *Malassezia*, conocido por su papel como comensal, patógeno y mutualista en la piel de humanos y animales, y *Mortierella*, con proporciones del 8,9 % y 8,6 % respectivamente (Figura 17B).

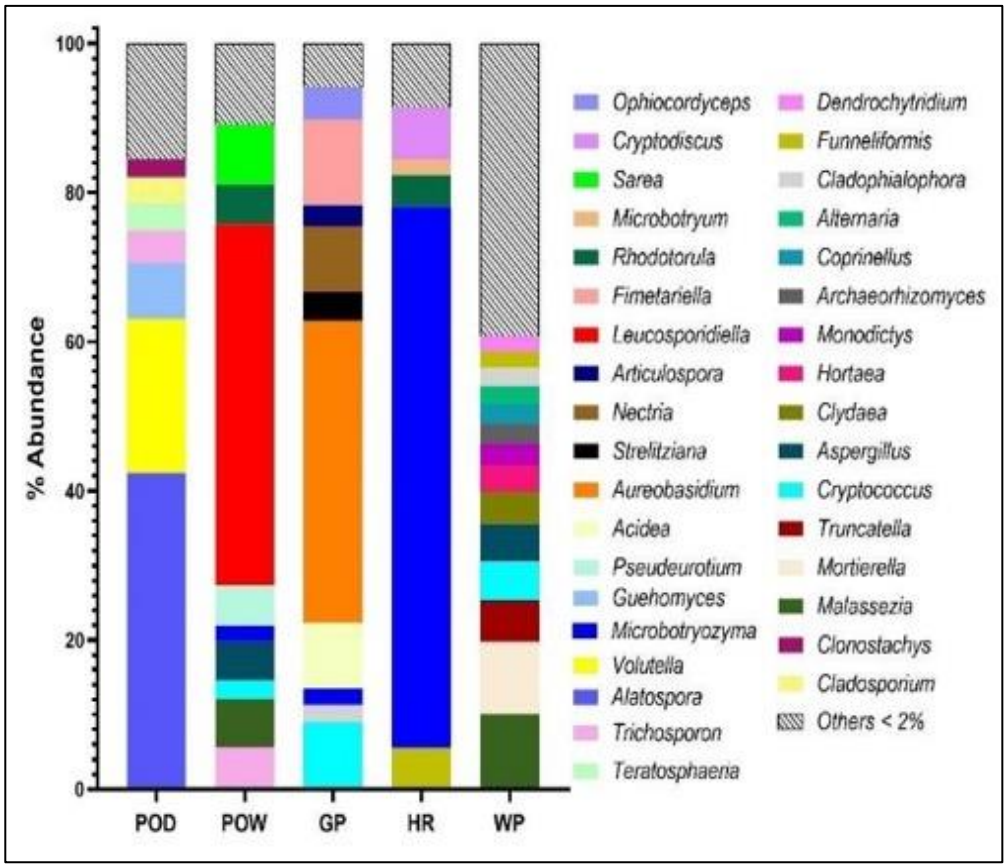
Figura 17

Abundancia relativa de géneros fúngicos. A. Suelos. B. Tajos

A



B



4.2. Aislamiento selectivo, identificación molecular y caracterización de microorganismos de interés

En los tres medios selectivos se logró aislar un total de catorce bacterias, todas ellas caracterizadas como Gram negativas y con morfología de bacilos. Adicionalmente, se obtuvo un aislado correspondiente a levadura y nueve hongos filamentosos (Tablas 6 y 7). La muestra UB2 no viró en el medio BSK y OB3 no viró en el medio NBRIP.

En la Tabla 8 se presentan los resultados correspondientes a las cianobacterias y/o microalgas, de las cuales se obtuvieron quince aislados en medio BG11, los cuales a pesar de los procedimientos de purificación aplicados, se mantuvieron en agrupaciones celulares (Figura 18). Cabe destacar que dos muestras (muestras 8 y 12) fueron descartadas debido a una alta contaminación por protozoarios.

Tabla 6

Bacterias y levaduras aislados en los medios selectivos

N°	Nombre Científico	Código	Muestra	Forma	Gram	ASHBY	NBRIP	BSK
							Crecimiento/ Viraje	
1	*Candida tropicalis*	L1	TCP	Redondas	-	Sí	No/Sí	Sí/No
2	*Serratia quinivorans*	L4	TSO	Bacilos	Negativa	Sí	Sí	Sí
3	*Serratia* sp.	OB2 OB1	PSP	Bacilos	Negativa	Sí	Sí	Sí
		UP2 UB2* UA2 OB3* UB3	TSO	Bacilos	Negativa	Sí	Sí	Sí
		OA4	TSC	Bacilos	Negativa	Sí	Sí	Sí/No
		OP1 OA1	TSD	Bacilos	Negativa	Sí	Sí	Sí
4	*Acinetobacter septicus*	OA2 OA3	TSC	Bacilos	Negativa	Sí	Sí	Sí
5	*Pandoraea terrigena*	UA3	TSO	Bacilos	Negativa	Sí	Sí	Sí/No

Según Rehman *et al*. (2010) y Amprayn *et al*. (2012), la levadura *Candida tropicalis*, además de su capacidad para quelar metales, posee un notable potencial como promotora del crecimiento radicular en plantas, tanto de forma

directa como indirecta. Esto la convierte en una herramienta valiosa para la agricultura sostenible y regenerativa, al contribuir a mejorar la producción vegetal y la sostenibilidad ambiental. Este microorganismo aislado en ambientes extremos contaminados por relaves mineros, representa un recurso biotecnológico prometedor para la biorremediación de suelos y aguas contaminadas con metales pesados.

Por su parte, Blanco *et al*. (2020) reportaron diversos géneros bacterianos con capacidad de solubilizar fósforo, entre ellos *Serratia* sp., aislada de suelos cultivados con cebolla. Esta bacteria podría emplearse como biofertilizante, favoreciendo la germinación y el desarrollo de dicho cultivo.

En relación con *Serratia quinivorans*, Chlebek *et al.* (2022) propusieron como un microorganismo con potencial para bioprocesos asociados a metales pesados, debido a su resistencia al hierro y al cobre. Para validar esta propuesta, es indispensable realizar experimentos que permitan cuantificar parámetros como la producción de biomasa, la formación de *biofilm*s, la capacidad reductora y la concentración mínima inhibitoria, lo cual permitiría establecer su utilidad en procesos como biominería, biorremediación y biosíntesis de nanopartículas metálicas.

Asimismo, Shi *et al.* (2011) destacó a *Acinetobacter* como una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPR), con aplicaciones potenciales en prácticas agrícolas sostenibles, tales como la fertilización biológica y el control de plagas.

Finalmente, Wang *et al.* (2019) y Miyauchi *et al.* (2022) describieron al género *Pandoraea* como una bacteria presente en suelos y cuerpos de agua, cuya actividad es clave para la formación y fertilidad del suelo, la retención de agua y el ciclo de nutrientes esenciales para el crecimiento vegetal. Además de contribuir con las comunidades de la rizosfera, esta bacteria es capaz de oxidar arsenito, crecer en suelos contaminados y contribuir a la biodegradación de compuestos orgánicos complejos, como la lignina, el biodiésel y diversos derivados del petróleo.

Tabla 7

Hongos aislados en los medios selectivos

N°	Nombre Científico	Código	Muestra	Aspecto	PDA	BSK	NBRIP	ASBHY
						Radio		
H1	*Penicillium scabrosum*	HUK 3.3	TSO	Blanco	Sí	6 mm	7 mm	5 mm
H2	*Talaromyces francoae*	HOK 7.4	TSD	Amarillo	Sí	6 mm	8 mm	5 mm
H3	*Trichoderma viridescens*	HOK6.5	TSC	Algodonoso	Sí	1.9 cm	1.8 cm	2 cm
H4	*Mucor hiemalis*	HOK 9.5	TSD	Algodonoso	Sí	5 mm	1 cm	1.5 cm
H5	*Pseudeurotium bakeri*	HUK 4.3	TSO	Blanco ramificado	Sí	5 mm	5 mm	4 mm
H6	*Penicillium nothofagi*	HPK 1.1	PSP	Blanco ramificado	Sí	1 cm	1 cm	1 cm
H7	*Penicillium pulvillorum*	HPK 2.1	PSP	Rosado	Sí	6 mm	7 mm	5 mm
H8	*Neurospora crassa*	HEB2.2	TCP	Plomo	Sí	1 cm	1 cm	1 cm
H9	*Pseudeurotium zonatum*	HEB 1.2	TCP	Plomo	Sí	1 cm	1 cm	1 cm

Entre los aislados de hongos tenemos a:

Penicillium scabrosum es una especie de hongo reconocida por su capacidad para producir metabolitos secundarios, entre los que se incluyen micotoxinas como el ácido penicílico, la roquefortina C y las chaetoglobosinas. Debido a estas propiedades, su estudio resulta fundamental en los campos de la seguridad alimentaria y la microbiología ambiental. Esta especie se encuentra comúnmente en suelos y alimentos almacenados, especialmente cereales, así como en regiones de clima frío o templado (Mun *et al*., 2020).

Talaromyces francoae es un hongo ascomiceto que se distingue por su amplia diversidad metabólica y su capacidad para sintetizar compuestos bioactivos. Se aísla frecuentemente en suelos, material vegetal en descomposición y ambientes extremos como cuevas, rocas e incluso hábitats marinos. Aunque existen pocos estudios específicos sobre *T. francoae*, es importante señalar que otras especies del género *Talaromyces* producen enzimas industriales (como celulasas y xilanasa), además de metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas y citotóxicas (Liu *et al*., 2022).

Trichoderma viridescens es una especie conocida por sus beneficios en agricultura y medio ambiente, gracias a su capacidad para degradar pesticidas,

hidrocarburos y metales pesados. Asimismo, promueve el crecimiento vegetal al estimular el desarrollo radicular, solubilizar fosfato y producir fitohormonas como el ácido indolacético (AIA). Este hongo se encuentra comúnmente en suelos, restos vegetales y madera en descomposición, especialmente en ambientes húmedos. También puede actuar como biocontrolador, ya que es capaz de inhibir, parasitar o atacar a hongos patógenos como *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Pythium*, mediante competencia por espacio y nutrientes, así como por la producción de enzimas como quitinasas que degradan las paredes celulares de otros hongos (Yao *et al*., 2023)

Mucor hiemalis es un hongo con la capacidad de degradar residuos farmacéuticos, pesticidas y colorantes textiles, lo que lo convierte en una opción prometedora para el tratamiento de aguas contaminadas. Presenta una alta tolerancia a compuestos tóxicos y favorece el crecimiento vegetal de forma indirecta a través de interacciones con la rizósfera (Hoque & Fritscher, 2019).

Pseudeurotium bakeri es un hongo micromiceto perteneciente al grupo Ascomycota. Es saprófito y se encuentra comúnmente en suelos y ambientes fríos. Este género ha sido objeto de estudio por su resistencia a condiciones extremas, su capacidad de adaptación fisiológica y, en algunos casos, por su rol en el biodeterioro o en interacciones con otros microorganismos (Duarte *et al*., 2018; Zhang *et al*., 2016).

Penicillium nothofagi fue descrito en 2016 a partir de muestras recolectadas en Nueva Zelanda, asociadas a las hojas del género arbóreo *Nothofagus*, característico del hemisferio sur. Esta especie forma parte de la sección *Lanata-Divaricata*, un grupo de *Penicillium,* cuyos miembros suelen aislarse de materiales vegetales. Aunque no existen estudios que confirmen sus propiedades antimicrobianas o antialgales, se presume que, al igual que otras especies del género, podría sintetizar metabolitos secundarios bioactivos (Houbraken, *et al*., 2011).

Penicillium es una especie recientemente descrita en estudios taxonómicos modernos. Se ha aislado de suelos y material vegetal en descomposición, aunque la información específica sobre su aislamiento y ecología sigue siendo

limitada. Se considera que, como otros miembros del género, podría poseer actividad antimicrobiana, aunque hasta ahora no se han publicado evidencias directas que lo confirmen (Visagie *et al*., 2016).

Neurospora crassa se ha utilizado en investigaciones de biorremediación en condiciones de laboratorio. Esta especie produce enzimas ligninolíticas eficaces en la degradación de materia orgánica, y destaca además como modelo genético y biotecnológico de gran utilidad (Díaz *et al*., 2020).

Pseudeurotium zonatum es un hongo ascomiceto que se caracteriza por su distintiva pigmentación zonada, lo cual le da su nombre. Aunque no se considera un patógeno ni posee aplicaciones industriales amplias, su resistencia y relevancia ecológica lo convierten en un organismo importante para estudios sobre biodiversidad fúngica y comunidades microbianas extremófilas. Se ha aislado en ambientes fríos, así como en suelos y materiales en descomposición (Gunde *et al*., 2018).

Tabla 8

Cianobacterias/microalgas aisladas en medio BG11

N°	Nombre Científico	Tipo	Código	Muestra	Crecimiento/ *Biofilm*
1	*Chlamydomonas*	Microalga verde unicelular	1	Coimolache DBO	Escaso/sí
	Pseudococcomyxa	Alga verde filamentosa			
2	*Chlamydomonas*	Microalga verde unicelular	4	Tecnosoil #06	Escaso/sí
	Pseudococcomyxa	Alga verde filamentosa			
	Coccomyxa	Microalga verde			
3	*Pseudococcomyxa*	Alga verde filamentosa	6	Suelo prístino	Sí
4	*Characium*	Alga verde unicelular con forma alargada	7	Hisopado tajo San Pedro #06	Escaso/sí
5	*Pedospumella*	Alga flagelada	8	Suelo 2 tajo	Sí
	Chlorella	Microalga verde unicelular			
	Fallacia	Diatomea			
6	*Chlamydomonas*	Microalga verde unicelular	9	Hold road #10	Sí

Continuación…					
7	*Pseudococcomyxa*	Alga verde filamentosa	10	Hisopado tajo San Pedro #06	Sí
9	*Dictyosphaerium*	Alga verde colonial	14	Planta exótica	Sí
10	*Characium*	Alga verde unicelular con forma alargada	15	Hisopado tajo San Pedro #09	Sí
	Chlorella	Microalga verde unicelular			
11	*Fallacia*	Diatomea	16	Planta silvestre	Sí
	Fistulifera	Diatomea oleaginosa			
	Pseudococcomyxa	Alga verde filamentosa			
13	*Eustigmatos*	Alga unicelular eustigmatofita	2*	Hold road #10	Sí
	Parietochloris	Alga verde extremófila			
	Bracteacoccus	Alga verde			
14	*Chlorella*	Microalga verde unicelular	B	Hisopado tajo San Pedro #01	Sí
	Pedospumella	Alga flagelada			
15	*Pedospumella*	Alga flagelada	C	7sp	Sí
	Chlamydomonas	Microalga verde unicelular			
	Desmonostoc	Cianobacteria o alga verde			
16	*Coelastrella*	Microalga verde	D	Suelo prístino	Sí
	Interfilum	Alga verde filamentosa			
17	*Bracteacoccus*	Alga verde	18	Topsoil san Pedro	Sí
	Pseudococcomyxa	Alga verde filamentosa			

Entre las microalgas evaluadas, se identificaron diversos géneros con distintos niveles de potencial para la biorremediación, clasificados según la cantidad de evidencia científica disponible y su eficacia reportada:

a. Géneros con un **muy alto** potencial de biorremediación:

Chlorella

Es una de las microalgas más ampliamente utilizadas en la biorremediación de metales pesados y compuestos orgánicos. Se emplea en el tratamiento de aguas residuales y también en fitorremediación. Su uso ha sido ampliamente documentado debido a su alta eficiencia en la remoción de contaminantes y su rápido crecimiento (Ramírez, 2020).

Chlamydomonas

Presenta una alta tasa de crecimiento, es fácil de cultivar y ha sido extensamente estudiada. Se ha utilizado en la remoción de metales pesados (Cd, Pb, Cr), nutrientes como nitrógeno y fósforo, así como compuestos orgánicos presentes en aguas residuales (Deng *et al*., 2010; Bayramoğlu *et al*., 2006).

Coccomyxa

Eficaz en la remoción de metales pesados y adaptada a ambientes contaminados. Algunas especies han sido investigadas en el contexto del tratamiento de aguas residuales. Sin embargo, se requiere una mayor validación experimental para confirmar su aplicabilidad a gran escala (Tripathi *et al*., 2022).

b. Géneros con potencial **medio-alto** de biorremediación: estos géneros se encuentran menos estudiados.

Fistulifera

Destaca por su adaptabilidad a entornos contaminados. Algunas especies han sido estudiadas por su capacidad para absorber metales pesados y también por su potencial en la producción de lípidos para biocombustibles (Sardo *et al*., 2021).

Eustigmatos

Se ha investigado por su resistencia en ambientes contaminados y su potencial uso en la producción de biocombustibles. Su interés radica en su tolerancia a condiciones extremas y su valor biotecnológico (Ahmed *et al*., 2022).

Coelastrella

Se ha analizado por su capacidad para tolerar ambientes contaminados y absorber metales pesados. Además, presenta aplicaciones en la producción de biocombustibles (Nayana *et al*., 2022).

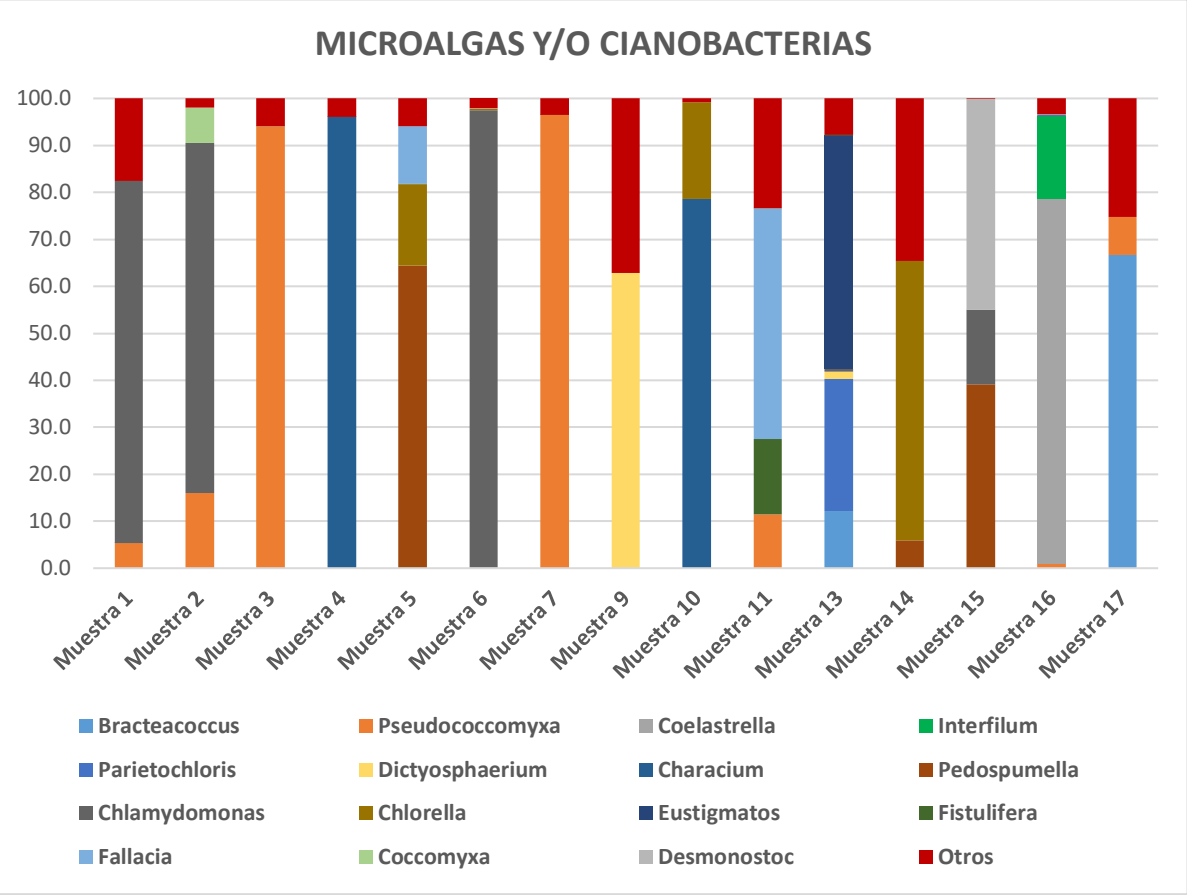
Parietochloris

Estudios preliminares indican su capacidad de tolerancia y remoción de contaminantes en condiciones ambientales extremas (Gao & Garcia-Pichel, 2011).

El resto de los géneros encontrados no presentan información suficiente o carecen de evidencia relevante que sustente su potencial en aplicaciones de biorremediación.

Figura 18

Cianobacterias/microalgas presentes en cada muestra



4.3. Pruebas de antagonismo

En las pruebas realizadas para evaluar la compatibilidad entre las 14 cepas bacterianas aisladas, se observó que únicamente las cepas UP2 y OA4 presentaron interacción antagónica. Aunque ambas pertenecen al género *Serratia sp.*, provienen de diferentes sitios de muestreo, MLZ y CMC respectivamente (Tabla 9).

Tabla 9

Prueba de compatibilidad entre bacterias

Código		OB 2	OB 1	UP 2	UB 2	UA 2	OB 3	UB 3	OA 4	OP 1	OA 1	UA 3	OA 2	OA 3	L4
Serratia sp.	OB2		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	OB1	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	UP2	+	+		+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	UB2	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	UA2	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
	OB3	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
	UB3	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+
	OA4	+	+	-	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+
	OP1	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+
	OA1	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+
Pandoraea terrigena	UA3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
Acinetobacter septicus	OA2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+
	OA3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+
Serratia quinivorans	L4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Según Muzio (2024), aunque el antagonismo entre bacterias del mismo género es posible, no es tan común como el observado entre géneros diferentes. Este fenómeno, en el que ciertas bacterias inhiben el crecimiento o la supervivencia de otras, puede estar mediado por diversos mecanismos, como la producción de sustancias antibióticas, la competencia por nutrientes y la liberación de enzimas que degradan moléculas esenciales.

El antagonismo intragénero puede originarse por la producción de compuestos químicos similares o por la competencia directa por recursos. No obstante, los procesos evolutivos y de adaptación dentro de un mismo género suelen reducir esta incompatibilidad, lo que hace que dicho antagonismo sea menos frecuente. A pesar de ello, existen casos documentados, como los observados en estudios sobre *Bacillus* y *Staphylococcus* (Kumar *et al*., 2017; Hibbing *et al*., 2010).

En cuanto a los hongos, se identificó un antagonismo pronunciado del hongo *Talaromyces francoae* frente a *Mucor hiemalis*, *Penicillium nothofagi*, *Penicillium pulvillorum*, *Pseudeurotium zonatum* y *Neurospora crassa*. Por otro lado, *Mucor hiemalis* mostró antagonismo únicamente con *Penicillium pulvillorum* y, como ya se mencionó, con *Talaromyces francoae* (Tabla 10).

Tabla 10

Prueba de compatibilidad entre hongos

Código	HOK 6.5	HOK 7.4	HOK 9.5	HUK 3.3	HUK 4.3	HPK 1.1	HPK 2.1	HEB 1.2	HEB 2.2
Trichoderma viridescens		+	+	+	+	+	+	+	+
Talaromyces francoae	+		-	+	+	-	-	-	-
Mucor hiemalis	+	-		+	+	+	-	+	+
Penicillium scabrosum	+	+	+		+	+	+	+	+
Pseudeurotium bakeri	+	+	+	+		+	+	+	+
Penicillium nothofagi	+	-	+	+	+		+	+	+
Penicillium pulvillorum	+	-	-	+	+	+		+	+
Pseudeurotium zonatum	+	-	+	+	+	+	+		+
Neurospora crassa	+	-	+	+	+	+	+	+	

Sin embargo, estos antagonismos no se encuentran documentados de manera específica en la literatura científica, aunque se pueden inferir a partir del conocimiento sobre las características de los géneros involucrados:

En el caso de *Talaromyces* y *Penicillium*, ambos son géneros de hongos reconocidos por su capacidad para producir metabolitos secundarios con propiedades inhibidoras, tales como ácidos orgánicos, alcaloides y antibióticos. Estos hongos desempeñan un papel clave en las interacciones competitivas en suelos y ambientes ricos en nutrientes. Por lo tanto, el antagonismo entre ellos puede depender de diversos factores, como el entorno específico, el medio de cultivo utilizado, las cepas involucradas y las condiciones experimentales (pH, temperatura y disponibilidad de nutrientes) (Frisvad *et al*., 2018).

Talaromyces se caracteriza por sus propiedades antifúngicas, atribuibles a la producción de metabolitos secundarios capaces de inhibir el crecimiento de otros hongos filamentosos. Esta capacidad resulta especialmente eficaz frente a hongos oportunistas de rápido crecimiento, como *Mucor hiemalis*, un zigomiceto que, si bien compite agresivamente por los nutrientes, suele ser más sensible a los compuestos antifúngicos producidos por otras especies (Lei *et al*., 2022; Suzuki *et al*., 2000).

Aunque *Neurospora crassa* es altamente competitiva en términos de ocupación de espacio y aprovechamiento de recursos, carece de mecanismos defensivos antifúngicos potentes. Por esta razón, puede ser desplazada por hongos como *Talaromyces*, que sí presentan actividad antimicrobiana. Así, resulta probable que en condiciones de laboratorio se manifieste un antagonismo entre ambas especies (Castellari *et al*., 2021; Sánchez *et al*., 2021).

Finalmente, existe una alta probabilidad de que *Penicillium pulvillorum* inhiba el crecimiento de *Mucor hiemalis* en pruebas de antagonismo, aunque no se ha identificado que sea el único hongo con esta capacidad. Es importante destacar que no se ha observado antagonismo con las otras especies de *Penicillium*, lo que sugiere que su capacidad inhibitoria podría depender tanto de la cepa como de las condiciones del medio.

Pruebas de antagonismo entre los grupos

1. Bacterias – Hongos

La compatibilidad entre las bacterias y los nueve hongos filamentosos fue en general compatible, con la excepción del hongo identificado como *Trichoderma viridescens*, el cual generó una leve inhibición en el crecimiento de las cepas bacterianas *Serratia sp.* (OA354, OP1, UP2, UA2, OB3, UB3) y *Pandoraea terrigena* (UA3) (Tabla 11).

De acuerdo con Wiest *et al.* (2022), *Trichoderma viridescens* es ampliamente reconocido por su capacidad para producir metabolitos secundarios con actividad antibacteriana, a pesar de que su principal actividad es antifúngica. Entre estos compuestos se encuentran los peptaiboles (péptidos antimicrobianos), ácidos orgánicos, trichoderminas y gliotoxinas. Estos metabolitos pueden dañar las membranas celulares bacterianas, inhibir la síntesis de proteínas o del ADN, así como interferir en rutas metabólicas esenciales.

Tabla 11

Prueba de compatibilidad entre bacterias y hongos filamentosos

		Hongos Filamentosos								
		HUK 3.3	HOK 7.4	HOK 6.5	HOK 9.5	HUK 4.3	HPK 1.1	HPK 2.1	HEB 2.2	HEB 1.2
Bacterias	L4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	OB2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	OB1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	OA4	+	+	+*	+	+	+	+	+	+
	OA2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	OA3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	OP1	+	+	+*	+	+	+	+	+	+
	OA1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	UP2	+	+	+*	+	+	+	+	+	+
	UB2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	UA2	+	+	+*	+	+	+	+	+	+
	OB3	+	+	+*	+	+	+	+	+	+
	UB3	+	+	+*	+	+	+	+	+	+
	UA3	+	+	+*	+	+	+	+	+	+

Nota. (+*) = con ligera inhibición de la bacteria

2. Bacterias – Cianobacterias/microalgas

En las pruebas de antagonismo entre bacterias y cianobacterias/microalgas, se observó que las cepas 9, 11, 14 y 16 exhibieron un crecimiento superior al del control en todos los tratamientos bacterianos. Las cepas 10 y 15, tanto con L4 como el consorcio 2, conformado por diferentes cepas de *Serratia sp.* (UB2, OA4, OB2) ejercieron un efecto positivo en comparación con el control. Las cepas 5 y 13 presentaron un crecimiento superior al del control cuando fueron tratadas con la bacteria *Serratia quinivorans* (L4). De manera similar, la cepa 6 obtuvo un mayor crecimiento sobre el consorcio 1, que esta compuesto por las bacterias *Pandoraea terrigena* (UA3), *Acinetobacter septicus* (OA2, OA3) y Serratia sp. (OP1).

Cabe destacar que, aunque se observaron variaciones en los niveles de crecimiento, en ninguno de los tratamientos se detectaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (Tabla 12).

Tabla 12

Prueba de compatibilidad entre consorcios bacterianos y cianobacterias y/o microalgas

			Tratamientos			
	N°	Nombre	L4	C1 UA3, OA2, OA3, OP1	C2 UB2, OA4, OB2	Control Solución salina 0.85 %
Cianobacterias/microalgas	1	*Chlamydomonas, Pseudococcomyxa*				✓
	2	*Chlamydomonas, Pseudococcomyxa, Coccomyxa*	-		-	✓
	3	*Pseudococcomyxa*	-	-	-	✓
	4	*Characium*	-	-	-	✓
	5	*Pedospumella, Chlorella, Fallacia*	+	-	-	✓
	6	*Chlamydomonas*		+*		✓
	7	*Pseudococcomyxa*	-	-	-	✓
	9	*Dictyosphaerium*	+*	+	+	✓
	10	*Characium, Chlorella*	+		+	✓
	11	*Fallacia, Fistulifera, Pseudococcomyxa*	+*	+*	+*	✓
	13	*Eustigmatos, Parietochloris, Bracteacoccus*	+*			✓
	14	*Chlorella, Pedospumella*	+*	+	+*	✓
	15	*Pedospumella, Chlamydomonas, Desmonostoc*	+*		+*	✓
	16	*Coelastrella, Interfilum*	+*	+	+*	✓
	17	*Bracteacoccus, Pseudococcomyxa*	-	-	-	✓

Nota. (-*) = crecimiento notable

Ponce (2024) señala que las microalgas poseen una notable actividad antibacteriana, atribuida a su capacidad para sintetizar una amplia variedad de metabolitos secundarios con propiedades bioactivas. Entre estos compuestos se encuentran los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), fitoesteroles, fenoles y flavonoides, así como pigmentos como carotenoides, clorofilas y ficobilinas, además de polisacáridos sulfatados. Estos metabolitos pueden alterar las membranas bacterianas, inhibir la replicación del ADN bacteriano y generar estrés oxidativo en las células microbianas.

En particular, *Chlorella* se distingue por sus compuestos activos, incluidos lípidos, polisacáridos y clorofilas, lo que le confiere aplicaciones potenciales en

áreas como la biofertilización, debido a sus propiedades antibacterianas. Asimismo, se emplea en la conservación de alimentos mediante bioconservantes naturales, en la formulación de productos cosméticos y farmacéuticos, y en el tratamiento de aguas residuales (Wang *et al*., 2023).

Por su parte, Zhou *et al.* (2020) y Berleman & Kirby (2009) sugieren que algunas cepas de *Serratia* pueden inhibir el crecimiento de microalgas, aunque este efecto depende de la especie de microalga, la cepa bacteriana y las condiciones del medio. *Serratia* es capaz de sintetizar diversos metabolitos antimicrobianos o tóxicos, como la prodigiosina, un pigmento rojo con propiedades antimicrobianas y citotóxicas que puede afectar tanto la fotosíntesis como la integridad celular de las algas. También produce enzimas hidrolíticas extracelulares como quitinasas, proteasas, nucleasas y lipasas, que degradan biomoléculas presentes en las microalgas, así como sideróforos que secuestran hierro, limitando su disponibilidad y provocando efectos líticos en ciertas algas verdes unicelulares.

La actividad inhibitoria de *Serratia* se manifiesta con mayor intensidad en condiciones de alta densidad bacteriana y medios pobres en nutrientes, lo que fomenta la competencia por recursos. La susceptibilidad de las microalgas a los metabolitos bacterianos desempeña un papel fundamental en este proceso. En este sentido, *Serratia quinivorans* ha demostrado eficiencia en la competencia por nutrientes, particularmente en medios ricos en carbono, donde puede restringir el crecimiento algal por limitación de recursos (Chlebek *et al*., 2022).

Además, se ha documentado que *Serratia* puede degradar compuestos tóxicos en ambientes acuáticos, modificando indirectamente las condiciones del medio e impactando indirectamente a las microalgas, lo que sugirie que su perfil bioquímico permite tal dicha interacción (Borah *et al*., 2019).

En cuanto al género *Acinetobacter*, Li *et al.* (2024) indican que se trata de un grupo microbiano versátil, capaz de competir con microalgas por nutrientes en condiciones limitadas. Algunas cepas de *Acinetobacter* producen biosurfactantes, sideróforos y enzimas que, potencialmente, podrían afectar a

microalgas sensibles. Sin embargo, *Acinetobacter septicus* es más conocido por su papel en entornos clínicos o en procesos de degradación de materia orgánica, más que por su interacción directa con microalgas.

3. Hongos – Cianobacterias/microalgas

En el análisis de compatibilidad entre hongos filamentosos y cianobacterias/microalgas, se observaron respuestas variables según la cepa de cianobacterias/microalgas y el hongo evaluado (Tabla 13).

La cepa 1 presentó diferencias significativas a favor del control en presencia de los hongos *Penicillium scabrosum* (H1), *Talaromyces francoae* (H2), *Trichoderma viridescens* (H3), *Penicillium nothofagi* (H6), *Penicillium pulvillorum* (H7) y *Pseudeurotium zonatum* (H9). No obstante, mostró un efecto positivo cuando fue tratada con *Mucor hiemalis* (H4), *Pseudeurotium bakeri* (H5) y *Neurospora crassa* (H8). Las cepas 2 y 14 exhibieron una mejora significativa frente al control cuando se inocularon con el hongo *Pseudeurotium zonatum*.

En el caso de la cepa 3, aunque no se detectaron diferencias significativas, se evidenció una tendencia de mejora con *Pseudeurotium bakeri* (H5). La cepa 4 presentó diferencias significativas en todas las condiciones, a favor del control, excepto con *Penicillium scabrosum* (H1), donde no hubo diferencia. Las cepas 5, 6 y 13 mostraron diferencias significativas en todos los tratamientos con hongos. En la cepa 7 no se evidenciaron diferencias significativas en ningún tratamiento.

Para la cepa 9 no se encontraron diferencias significativas; sin embargo, se observó una mejora con respecto al control con *Neurospora crassa* (H8). La cepa 10 presentó diferencias significativas a favor del control con todos los hongos, excepto con *Mucor hiemalis* (H4). En la cepa 11, *Mucor hiemalis* generó una diferencia significativa favorable respecto al control. La cepa 15 mostró diferencias significativas a favor del control con *Penicillium scabrosum* (H1), *Trichoderma viridescens* (H3), *Penicillium nothofagi* (H6) y *Pseudeurotium zonatum* (H9).

Para la cepa 16 se detectaron diferencias significativas a favor del control en los tratamientos con *Pseudeurotium bakeri* (H5) y *Penicillium nothofagi* (H6), aunque se evidenció una mejora con Talaromyces francoae (H2). Finalmente, la cepa 17 mostró diferencias significativas a favor del control con *Mucor hiemalis* (H4), *Penicillium nothofagi* (H6) y *Penicillium pulvillorum* (H7), pero presentó una mejora con *Pseudeurotium zonatum* (H9), seguida por *Pseudeurotium bakeri* (H5).

Estas interacciones específicas entre los hongos y las cepas de cianobacterias/microalgas, reflejan efectos tanto positivos como negativos dependiendo de la combinación evaluada.

Tabla 13

Prueba de compatibilidad entre hongos y cianobacterias/microalgas

			Hongos Filamentosos									
	N°	Muestra	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	Control
Cianobacterias/microalgas	1	*Chlamydomonas, Pseudococcomyxa*				+++	+			++		✓
	2	*Chlamydomonas, Pseudococcomyxa, Coccomyxa*									+++	✓
	3	*Pseudococcomyxa*					++					✓
	4	*Characium*	+									✓
	5	*Pedospumella, Chlorella, Fallacia*			++						++	✓
	6	*Chlamydomonas*				+				++		✓
	7	*Pseudococcomyxa*	++	+								✓
	9	*Dictyosphaerium*		+						++	+	✓
	10	*Characium,Chlorella*		+		++						✓
	11	*Fallacia, Fistulifera, Pseudococcomyxa*				+++						✓
	13	*Eustigmatos, Parietochloris, Bracteacoccus*										✓
	14	*Chlorella, Pedospumella*	+				+				+++	✓
	15	*Pedospumella, Chlamydomonas, Desmonostoc*				++	++			++		✓
	16	*Coelastrella, Interfilum*		+++		++				+		✓
	17	*Bracteacoccus, Pseudococcomyxa*		+			++				+++	✓

Nota. La intensidad del crecimiento se representa cualitativamente con los signos "+" (escaso), "++" (moderado) y "+++" (abundante). La columna "Control" indica la presencia de crecimiento en controles sin inoculación con hongos.

Según Lauritano & Galasso (2023), el antagonismo entre hongos y microalgas constituye una interacción ecológica en la cual los hongos afectan negativamente el crecimiento, metabolismo o viabilidad de las microalgas. Este fenómeno se puede presentar tanto en ambientes naturales, como ecosistemas acuáticos, así como en sistemas controlados como biorreactores, escenarios de biocontrol o competencia experimental. Existen distintos mecanismos mediante los cuales este antagonismo puede manifestarse. Uno de ellos es la producción de metabolitos antifototróficos por parte de los hongos, tales como ácidos orgánicos, enzimas hidrolíticas o toxinas, que alteran la integridad celular y afectan la fotosíntesis de las microalgas. Otro mecanismo posible es la competencia por nutrientes, donde hongos y microalgas compiten por recursos limitados como nitrógeno, fósforo o carbono en medios compartidos, lo que puede restringir el desarrollo algal.

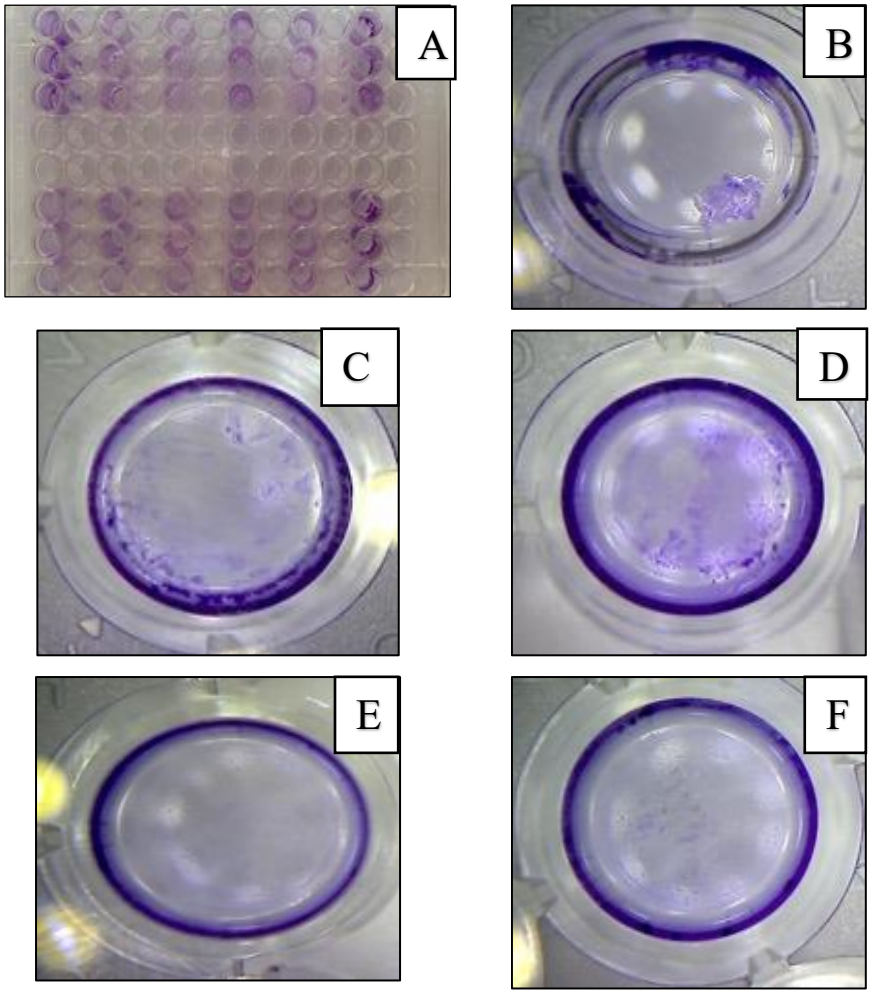
4.4. Formación de biopelículas de bacterias y levaduras para la formulación de consorcios

El presente ensayo se fundamenta en la identificación de microorganismos con capacidad de formación de biofilm durante el período de incubación. Según Moreno *et al*. (2023), las biopelículas se adhieren a las paredes del pocillo formando un anillo que se tiñe con cristal violeta para su visualización.

En este contexto, se utilizó la cepa bacteriana *Acinetobacter septicus* (OA3) como control positivo, dado que es la única que presenta una formación evidente de *biofilm*. Los resultados permitieron confirmar la capacidad de formación de *biofilm* de otra cepa de *Acinetobacter septicus* (OA2), aislada de la capa superior del depósito Coimolache, de *Serratia sp.* (OP1), extraída de la capa superior del depósito 1 en CMC, de *Pandoraea terrigena* (UA3) y de *Serratia quinivorans* (L4), provenientes del depósito DMO en MLZ (Figura 19).

Figura 19

A. Ensayo de producción de *biofilm*. B. *Acinetobacter septicus* (OA3): Control Positivo. C. *Acinetobacter septicus* (OA2). D. *Pandoraea terrigena* (UA3). E. *Serratia sp.* (OP1). F. *Serratia quinivorans* (L4)



Existen múltiples métodos para la cuantificación del biopelículas; sin embargo, la técnica de microplaca con tinción de cristal violeta es una de las más utilizadas en laboratorios de microbiología para la detección de biopelículas. Este enfoque se considera un estándar de referencia debido a que permite clasificar las cepas bacterianas como productoras fuertes, moderadas, débiles o no productoras de biopelículas. Su popularidad radica en que es un procedimiento rápido, sencillo y de bajo costo. No obstante, presenta ciertas limitaciones en su sensibilidad es reducida y, al tratarse de una técnica cualitativa, no permite una cuantificación precisa de la capacidad formadora de biopelículas (O'Toole, 2011).

4.5. Masificación de microorganismos de los consorcios seleccionados para roca

Crecimiento óptimo de los microorganismos a diversas concentraciones de melaza

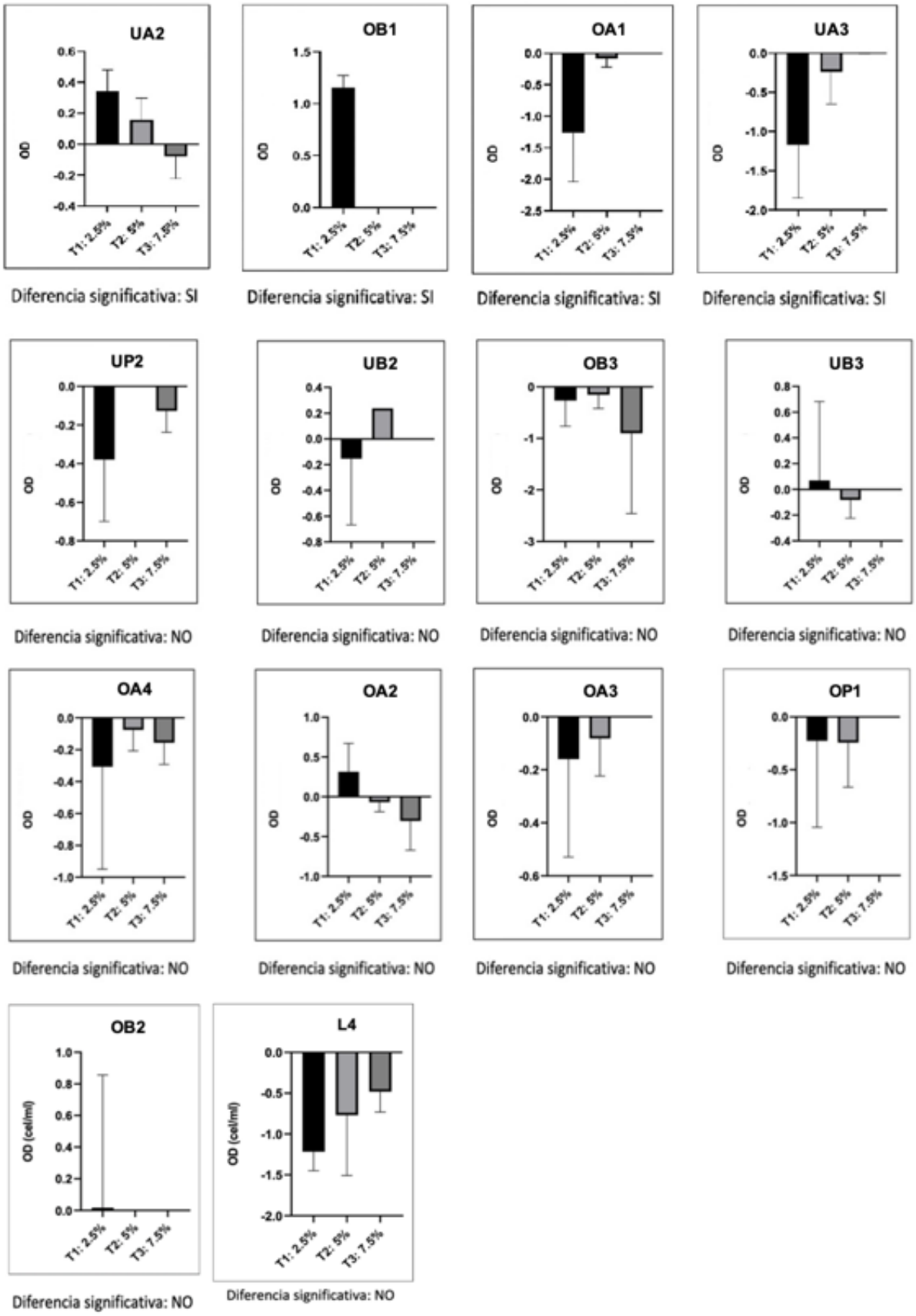
1. Bacterias

Se utilizó melaza como medio de cultivo con el objetivo de determinar la concentración más adecuada para promover el crecimiento óptimo de los microorganismos aislados. En el caso de la bacteria *Serratia sp.* (UA2), se observó una diferencia significativa positiva al comparar el tratamiento de menor concentración con el de mayor (7.5 %). Para otra cepa de *Serratia sp.* (OB1) también se detectaron diferencias significativas positivas para el tratamiento al 2.5 %. Por el contrario, otra tipo de cepa *Serratia sp.* (OA1) se registraron diferencias significativas negativas bajo las mismas condiciones, al igual que en *Pandoraea terrigena* (UA3), donde la mayor concentración (7.5 %) afectó negativamente el crecimiento. Cabe resaltar que las tres cepas de *Serratia sp.* utilizadas para el ensayo fueron extraídas de diferentes lugares.

Las demás cepas no mostraron diferencias estadísticamente significativas, aunque en la mayoría de los casos se evidenció una tendencia negativa, con excepción de las cepas de *Serratia sp.* con los códigos UB2 (al 5 %) y OB2 (al 2.5 %, en todos los tratamientos). Lo que permite concluir que la concentración de melaza más efectiva para la masificación bacteriana fue del 2.5 %, ya que permitió alcanzar valores de densidad óptica (OD) cercanos a 1 entre las 16 y 20 horas de incubación. Se infiere que concentraciones superiores tienden a inhibir el crecimiento microbiano, y concentraciones menores podrían ser favorables (Figura 20).

Figura 20

Crecimiento de bacterias a diversas concentraciones de melaza



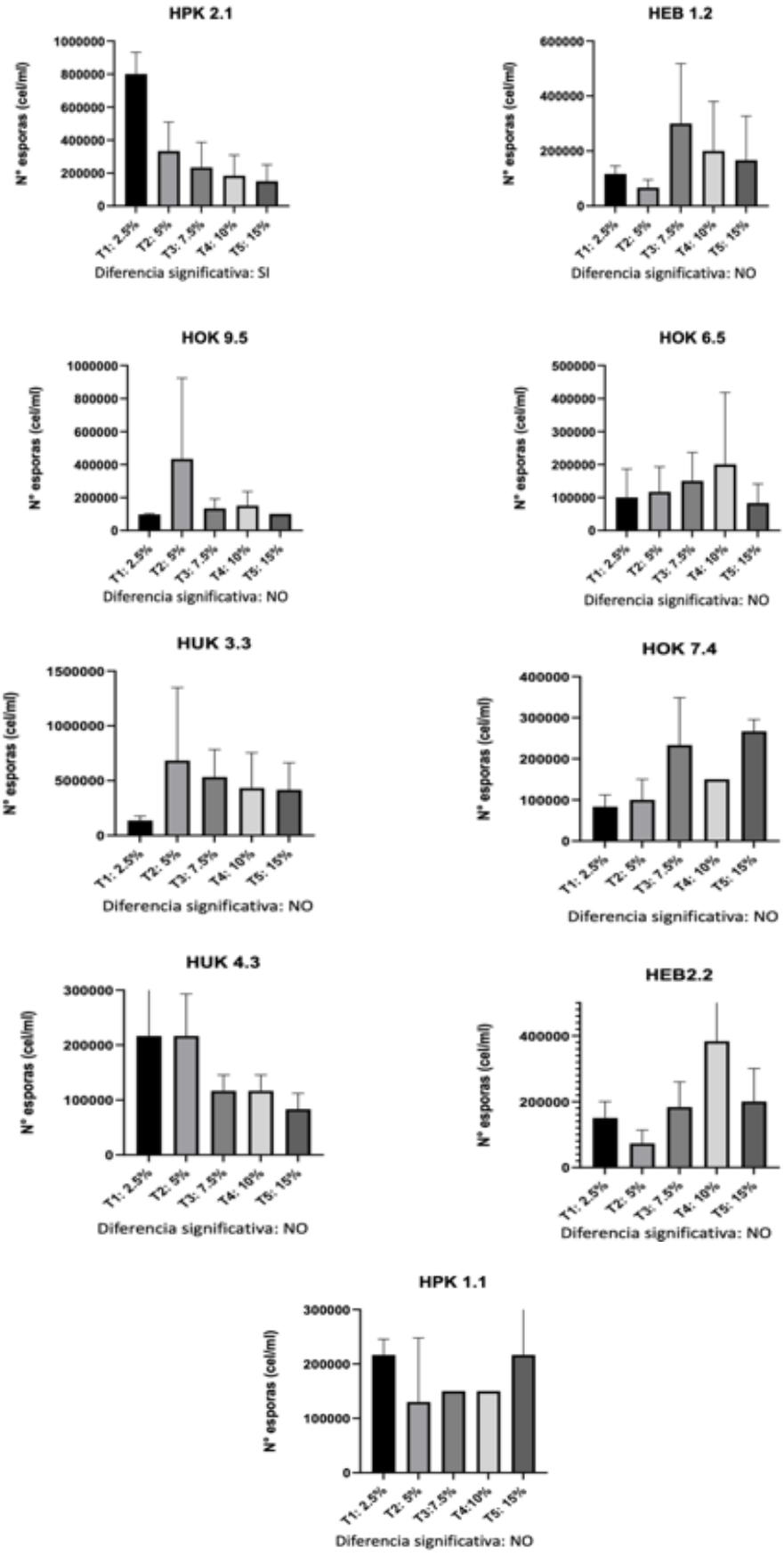
Según Zhang *et al*., (2023), el estudio del crecimiento óptimo de bacterias en función de distintas concentraciones de melaza representa un tema relevante en el campo de la microbiología aplicada, especialmente en contextos biotecnológicos, ya que la melaza, subproducto de la industria azucarera, es una fuente rica en azúcares como sacarosa, glucosa y fructosa, lo que la convierte en un recurso valioso como fuente de carbono y energía para diversos microorganismos. No obstante, concentraciones elevadas de melaza pueden afectar negativamente el crecimiento bacteriano, posiblemente debido a efectos osmóticos, disminución del oxígeno disuelto o acumulación de metabolitos tóxicos.

2. Hongos

En el caso de los hongos filamentosos, las gráficas muestran que *Penicillium nothofagi* (HPK 1.1) presentó un crecimiento óptimo al 2.5 % de melaza, mientras que *Penicillium pulvillorum* (HPK 2.1) y *Pseudeurotium bakeri* (HUK 4.3) crecieron favorablemente entre el 2.5 % y 5 %. *Mucor hiemalis* (HOK 9.5) alcanzó su crecimiento máximo únicamente al 5 %, y *Penicillium scabrosum* (HUK 3.3) lo hizo entre el 5 % y 7.5 %. Por su parte, *Talaromyces francoae* (HOK 7.4) mostró desarrollo solo al 7.5 %, mientras que *Pseudeurotium zonatum* (HEB 1.2) y *Trichoderma viridescens* (HOK 6.5) presentaron crecimiento entre el 7.5 % y 10 %. Finalmente, *Neurospora crassa* (HEB 2.2) creció únicamente al 10 % de melaza. La concentración del 15 % fue descartada por no favorecer el crecimiento de la mayoría de los hongos evaluados. Cabe resaltar que solo se observó diferencia significativa en el hongo HPK 2.1 (Figura 21).

Figura 21

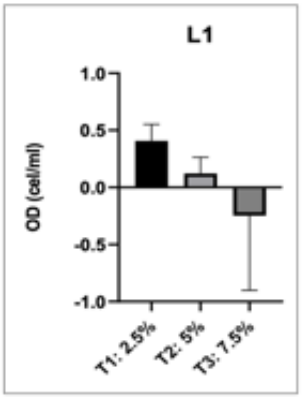
Crecimiento hongos filamentosos a diversas concentraciones de melaza



2En el caso de *Candida tropicalis* (L1), no se observó una diferencia significativa entre tratamientos, aunque se evidenció una relación negativa a la concentración del 7.5 % (Figura 22).

Figura 22

Crecimiento de Candida tropicalis (L1) *a diversas concentraciones de melaza*



Diferencia significativa: NO

De manera similar, Ossa *et al.* (2010) señala que la melaza puede servir como una fuente eficaz de carbono para el crecimiento de bacterias, levaduras y hongos filamentosos, aunque no proporciona todos los micronutrientes esenciales para un desarrollo óptimo. Estudios indican que existe una concentración óptima de melaza para maximizar el crecimiento microbiano, ya que concentraciones por debajo o por encima de este umbral pueden limitar el desarrollo debido a desequilibrios en la disponibilidad de nutrientes y condiciones fisiológicas del microorganismo.

Curvas de crecimiento al 2.5 % de melaza de levaduras y bacterias

Se analizaron las curvas de crecimiento de 14 cepas bacterianas y la levadura utilizando melaza al 2.5 % como único medio de cultivo. La mayoría de las bacterias lograron alcanzar valores de densidad óptica (OD) cercanos a 1 entre las 16 y 18 horas, alcanzando su punto máximo a las 20 horas. La bacteria *Serratia quinivorans* (L4) fue la excepción, ya que no presentó un patrón de crecimiento definido (Figura 23). *Candida tropicalis* alcanzó el valor de 1 OD a las 24 horas de incubación (Figura 24).

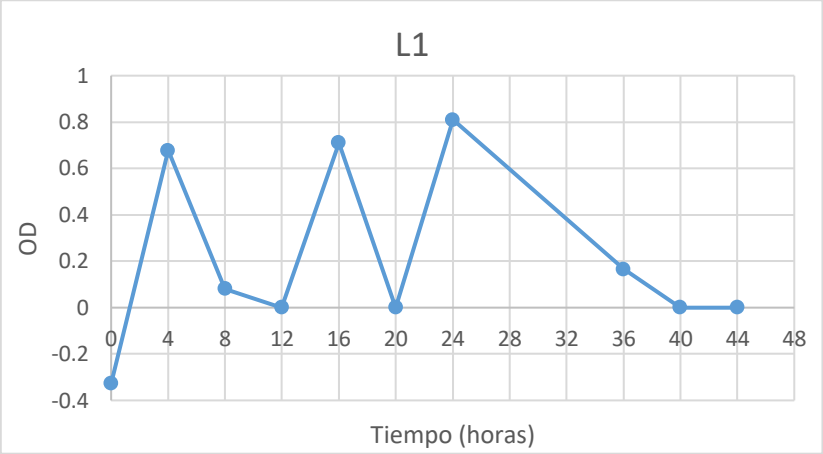
Figura 23

Crecimiento de la bacteria Serratia quinivorans (L4) al 2.5 % de melaza



Figura 24

Crecimiento de levadura Candida tropicalis (L1) al 2.5 % de melaza



Curvas de crecimiento bacteriano a 20 °C y 30 °C

Las curvas de crecimiento bacteriano en medio LB a diferentes temperaturas (20 °C y 30 °C) permiten analizar el efecto de este parámetro sobre la velocidad de crecimiento microbiano (Sarti *et al*., 2019). Generalmente, las bacterias tienden a crecer más rápidamente a temperaturas elevadas. Sin embargo, las cepas bacterianas aisladas de ambientes fríos mostraron un comportamiento similar a 20 °C y 30 °C, con excepción de la cepa *Acinetobacter septicus* (OA2), que alcanzó una densidad óptica de 1 en un tiempo menor cuando fue cultivada a 30 °C (Tabla 14).

Tabla 14

Curvas de Crecimiento Bacteriano en Medio LB a 20 °C y 30 °C

Nombre científico	Código	OD = 1							
		6H		12H		30H		MÁS DE 42H	
		20°C	30°C	20°C	30°C	20°C	30°C	20°C	30°C
Serratia sp.	OA4			✓	✓				
	OP1	✓	✓						
	OA1			✓	✓				
	UP2	✓	✓						
	UB2	✓	✓						
	UA2	✓	✓						
	OB3	✓	✓						
	UB3	✓	✓						
	OB2			✓	✓				
	OB1			✓	✓				
Acinetobacter septicus	OA2						✓	✓	
	OA3							✓	✓
Pandoraea terrigena	UA3					✓	✓		

4.6. Ensayo de colonización de microorganismos formadores de biopelículas a pequeña escala en el laboratorio

Bioensayo de colonización de bacterias, hongos, cianobacterias/microalgas en rocas

En el presente ensayo se observó que las cinco cepas de microalgas evaluadas contribuyeron a mejorar el pH del agua utilizada para el lavado de la roca. Las cepas 1, 2 y 3 mostraron un aumento significativo del pH, superior a una unidad, mientras que las cepas 6 y 10 presentaron incrementos mínimos.

En cuanto a las bacterias, todas las cepas contribuyeron a mejorar el pH del agua de lavado. Por el contrario, las cepas fúngicas favorecieron la acidificación del medio, intensificando el proceso de disolución de la roca. Este efecto sugiere su posible aplicación en procesos de biorremediación o en la recuperación ecológica de pasivos ambientales en minas de oro, donde la movilización controlada de metales podría contribuir a la estabilización o la degradación de sustratos inorgánicos difíciles de tratar (Tabla 15).

Tabla 15

pH promedio del agua de las rocas

	Código	Nombre científico	pH inicial	pH final	Diferencia del pH
Microalgas	cepa 1	*Chlamydomonas, Pseudococcomyxa*	4.7	7.1	2.4
	cepa 2	*Chlamydomonas, Pseudococcomyxa, Coccomyxa*	4.5	5.8	1.3
	cepa 3	*Pseudococcomyxa*	4.2	5.4	1.2
	cepa 6	*Chlamydomonas*	4.5	4.9	0.4
	cepa 10	*Characium, Chlorella*	3.7	3.9	0.2
	Control	Agua destilada	4.8	4.3	-0.5
Bacterias	L4	*Serratia quinivorans*	5.3	8.4	3.1
	UA3	*Pandoraea terrigena*	4.8	8.1	3.3
	OP1	Serratia sp.	3.8	8.2	4.4
	OA3	*Acinetobacter septicus*	5.1	8.4	3.3
	OA2	*Acinetobacter septicus*	4.3	8.5	4.2
	Control con LB		4	4	0
Hongos	HUK 3.3	*Penicillium scabrosum*	4.4	2.9	-1.5
	HOK 7.4	*Talaromyces francoae*	5.0	2.5	-2.5
	HOK 6.5	*Trichoderma viridescens*	5.5	2.5	-3.0
	HOK 9.5	*Mucor hiemalis*	4.4	2.5	-1.9
	HUK 4.3	*Pseudeurotium bakeri*	5.8	2.5	-3.3
	HPK 1.1	*Penicillium nothofagi*	5.7	3.2	-2.5
	HPK 2.1	*Penicillium pulvillorum*	5.6	2.8	-2.8
	HEB 2.2	*Neurospora crassa*	3.9	2.7	-1.2
	HEB 1.2	*Pseudeurotium zonatum*	4.7	3.3	-1.4
	Control H	Control con PDB	5.1	3.3	-1.8

La colonización de superficies minerales por microorganismos constituye un proceso ecológico clave, particularmente en ambientes naturales y extremos. Evaluar la capacidad de colonización de bacterias, hongos y cianobacterias/microalgas sobre rocas permite una mejor comprensión de los procesos iniciales de sucesión microbiana, así como fenómenos asociados como el biodeterioro, la biocorrosión y la formación de biocostras. Estos

procesos son esenciales para la dinámica del suelo, la rehabilitación de áreas degradadas y la conservación del patrimonio geológico (Galindo *et al*., 2018).

En el segundo ensayo (Tabla 16), en el que se utilizó melaza como medio de masificación para los inóculos individuales y en consorcio, se corroboró que las bacterias contribuyen a mejorar el pH del agua de lavado de roca, siendo más destacadas *Pandoraea terrigena* (UA3), *Serratia sp.* (OP1) y el mix bacteriano (Figura 25). Este efecto sugiere un potencial uso de estas bacterias en estrategias de biorremediación y manejo de aguas ácidas asociadas a la minería del oro, mejorando así la calidad del entorno y promoviendo prácticas más sostenibles.

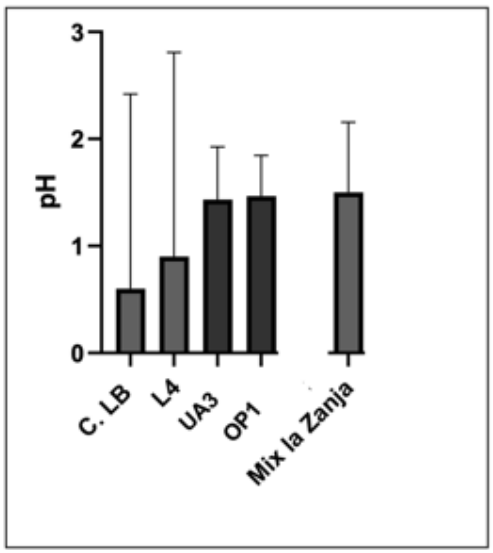
Tabla 16

Medida del pH del lavado de rocas con inóculos masificados en melaza

N°	Descripción	Repetición	pH inicial	pH final	Diferencia del pH
1	Control LB	1	6.6	8.2	1.6
		2	5.8	7.5	1.7
		3	5	3.5	-1.5
		$\overline{X}$	**5.8**	**6.4**	**0.6**
2	*Serratia quinivorans* L4	1	5	7.7	2.7
		2	5.1	4	-1.1
		3	6.7	7.8	1.1
		$\overline{X}$	**5.6**	**6.5**	**0.9**
3	*Pandoraea terrigena* UA3	1	5.5	7.5	2
		2	6.7	7.8	1.1
		3	6.2	7.4	1.2
		$\overline{X}$	**6.13**	**7.56**	**1.43**
4	*Serratia sp.* OP1	1	6	7.2	1.2
		2	6.3	7.6	1.3
		3	5.9	7.8	1.9
		$\overline{X}$	**6.1**	**7.53**	**1.43**
5	MIX ZANJA	1	5.7	7.9	2.2
		2	6.9	7.8	0.9
		3	6.3	7.7	1.4
		$\overline{X}$	**6.3**	**7.8**	**1.5**

Figura 25

pH promedio del lavado de rocas



Además, estudios como el de Supanitsky & Zorreguieta (2022) subrayan que la formación de *biofilm*s en superficies minerales ofrece a los microorganismos ventajas adaptativas frente a condiciones de estrés ambiental, lo que resulta de interés profundizar en su conocimiento. En su investigación se analizó la capacidad formadora de *biofilm*s de los géneros *Pseudomonas* y *Burkholderia*, quienes presentan características prometedoras para el desarrollo agrícola sostenible, actuando como biocontroladores o promotores del crecimiento vegetal (PGPR), bajo condiciones de cultivo *in vitro* para evaluar la biomasa adherida a soportes abióticos y bióticos. Los aislados de *Pseudomonas* mostraron una mayor diversidad de fenotipos relacionados con superficies y un mejor desempeño en la formación de *biofilm*s sobre poliestireno y raíces de trigo, en comparación con los aislados de *Burkholderia*. Además, al enfrentar factores adversos, la formación de *biofilm*s se intensificó como un mecanismo de supervivencia.

Bioensayo de cianobacterias/microalgas en diferentes sustratos

El objetivo de este ensayo fue simular las condiciones ambientales que los microorganismos podría encontrar en su hábitat natural, evaluando su capacidad de adaptación y colonización. La evaluación se realizó 6 días despúes de cada aplicación. Se observó que, tras la primera roceada,

únicamente la cepa proveniente de una planta silvestre, compuesta por *Pedospumella*, *Chlamydomonas* y *Desmonostoc* (cepa 15), cultivada en melaza al 2.5 %, logró colonizar visualmente la superficie semilisa (loseta). Es importante destacar que esta cepa fue la única que contenía una cianobacteria. Por otro lado, la cepa prístina conformada por *Pseudococcomyxa* (cepa 3) solo pudo ser observada mediante microscopía (Figuras 26 y 27).

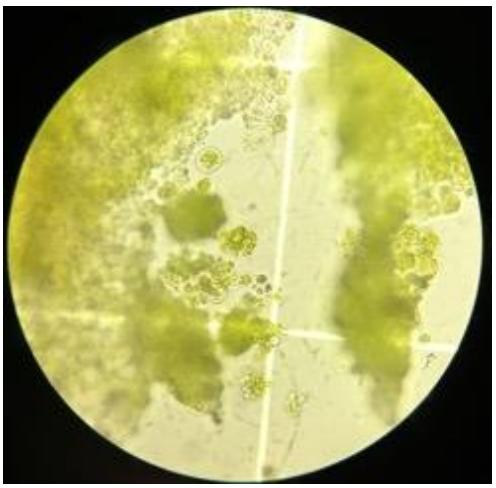
Figura 26

Colonización de superficie semilisa



Figura 27

Presencia de Pseudococcomyxa (cepa 3) *en loseta*



Whitton (2012) señalan que las cianobacterias son frecuentemente los primeros organismos en colonizar ambientes adversos o extremos, gracias a una serie de características fisiológicas y ecológicas que les confieren una notable resistencia. Estas incluyen la tolerancia a condiciones extremas como

radiación UV intensa, temperaturas extremas, escasez de nutrientes y alta salinidad. Una de sus principales ventajas adaptativas es la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (N_2), lo cual resulta fundamental en suelos o superficies con baja disponibilidad de nutrientes.

Adicionalmente, Gantar & Elhai (1999) y Castenholz (2001), en sus libros resaltan que las cianobacterias producen sustancias protectoras como mucílagos y *biofilm*s, los cuales forman una matriz de exopolisacáridos que no solo las protege, sino que también ayuda a retener la humedad, vital para su supervivencia. Al ser organismos fotosintéticos, no dependen de materia orgánica para su crecimiento, lo que les permite generar energía y oxígeno desde las etapas iniciales de colonización. Gracias a estas adaptaciones, las cianobacterias cumplen un rol crucial como especies pioneras en la sucesión ecológica primaria, facilitando la colonización de ambientes inhóspitos como rocas desnudas, suelos volcánicos, glaciares y desiertos. Por estas razones, su estudio reviste especial importancia en el contexto de la presente investigación.

Bioensayo de cianobacterias/microalgas en rocas de gran tamaño

El objetivo de este ensayo fue determinar un sustrato adecuado que favorezca el crecimiento y la colonización de cianobacterias/microalgas sobre superficies rocosas. La Figura 28 muestra que, en rocas de mayor tamaño, se evidenció el desarrollo de la microalga *Pseudococcomyxa* (cepa 3) al utilizar como medio de soporte una solución de melaza al 1.5 % diluida en agua destilada. Este sustrato no solo promovió el crecimiento, sino que también facilitó la formación de un *biofilm*, lo cual confirma la eficacia de la melaza como medio nutritivo para la adhesión y proliferación de cianobacterias/microalgas en condiciones de laboratorio.

Figura 28

Colonización de la microalga Pseudococcomyxa (cepa 3) *en roca*



En resumen, el bioensayo de colonización microbiana sobre rocas no solo permite identificar la afinidad de determinados grupos microbianos por distintos tipos de sustratos, sino que también proporciona información relevante sobre su rol ecológico en los ciclos geoquímicos y en la transformación de los paisajes terrestres a lo largo del tiempo (Fortin *et al*., 1997).

4.7. Sucesión ecológica

Ensayo de crecimiento de hongos y microalgas en rocas

La Tabla 17 clasifica el crecimiento observado: 0 indica ausencia de crecimiento, 1 representa un crecimiento escaso, 2 un crecimiento regular y 3 una colonización evidente del sustrato. El objetivo de este ensayo fue evaluar si el orden de inoculación entre hongos y microalgas influye en su crecimiento.

Tabla 17

Crecimiento de cepas de microalgas y hongos

Código	1° Microalgas 2° Hongos 16 Días Microalgas 10 Días Hongos	Código	1° Hongos 2° Microalgas 15 Días Hongos 9 Días Microalgas
C3+H1	0	H1+C3	3
C3+H2	0	H2+C3	1
C3+H3	0	H3+C3	0
C3+H4	0	H4+C3	0
C3+H5	0	H5+C3	1
C3+H6	0	H6+C3	2
C3+H7	0	H7+C3	1
C3+H8	0	H8+C3	2
C3+H9	**2**	**H9+C3**	**2**
C4+H1	**2**	**H1+C4**	**2**
C4+H2	**1**	**H2+C4**	**1**
C4+H3	0	H3+C4	0
C4+H4	0	H4+C4	0
C4+H5	0	H5+C4	0
C4+H6	**2**	**H6+C4**	**2**
C4+H7	0	H7+C4	2
C4+H8	0	H8+C4	1
C4+H9	0	H9+C4	1
C11+H1	0	H1+C11	2
C11+H2	0	H2+C11	1
C11+H3	0	H3+C11	0
C11+H4	1	H4+C11	0
C11+H5	0	H5+C11	0
C11+H6	0	H6+C11	1
C11+H7	0	H7+C11	1
C11+H8	0	H8+C11	0
C11+H9	0	H9+C11	1
Control	0	Control	0

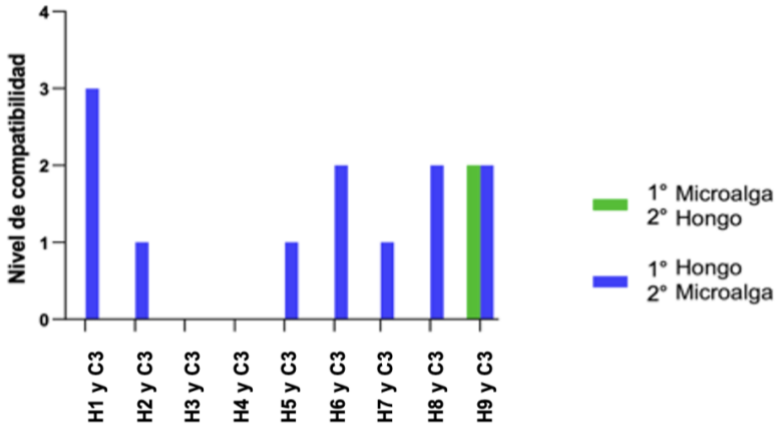
Se observó que los hongos permanecen activos solo durante los primeros días, siempre que dispongan del medio de cultivo (PDB) y de condiciones adecuadas de humedad. Posteriormente, ante la escasez de nutrientes, la pérdida de humedad o la falta de superficie para su expansión, su crecimiento disminuye, dando pasa a la formación de esporas como mecanismo de supervivencia. Estos resultados sugieren que los hongos tienen un ciclo activo limitado y que su capacidad de interacción con microalgas podría depender del momento de inoculación y de la disponibilidad de recursos.

En cuanto al crecimiento de los nueve hongos con *Pseudococcomyxa* (microalga 3), se observó que sembrar primero los hongos *Penicillium*

scabrosum (H1), *Talaromyces francoae* (H2), *Pseudeurotium bakeri* (H5), *Penicillium nothofagi* (H6), *Penicillium pulvillorum* (H7) y *Neurospora crassa* (H8) seguido de la microalga, favoreció su crecimiento, siendo los hongos 1, 6 y 8 los que presentaron una mayor colonización. En el caso *del Pseudeurotium zonatum* (H9), el orden de siembra no tuvo un efecto diferencial sobre su desarrollo (Figura 29).

Figura 29

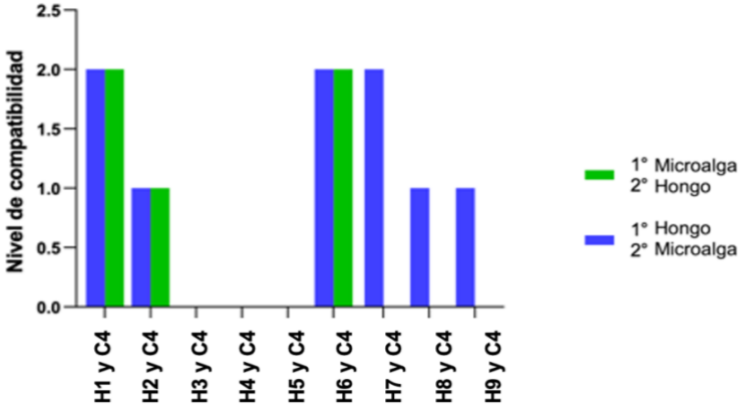
Crecimiento de hongos filamentosos y Pseudococcomyxa (cepa 3)



Para evaluar el crecimiento de los hongos con *Characium* (microalga 4), se observó que en los casos del 1 al 6 no hubo diferencias significativas entre sembrarlos antes o después de la microalga, lo que sugiere una alta tolerancia y posible coexistencia. Sin embargo, en los hongos *Penicillium pulvillorum* (H7), *Neurospora crassa* (H8) y *Pseudeurotium zonatum* (H9), el crecimiento solo fue evidente cuando se sembraron previamente, indicando que su desarrollo podría verse inhibido por la presencia inicial de la microalga (Figura 30).

Figura 30

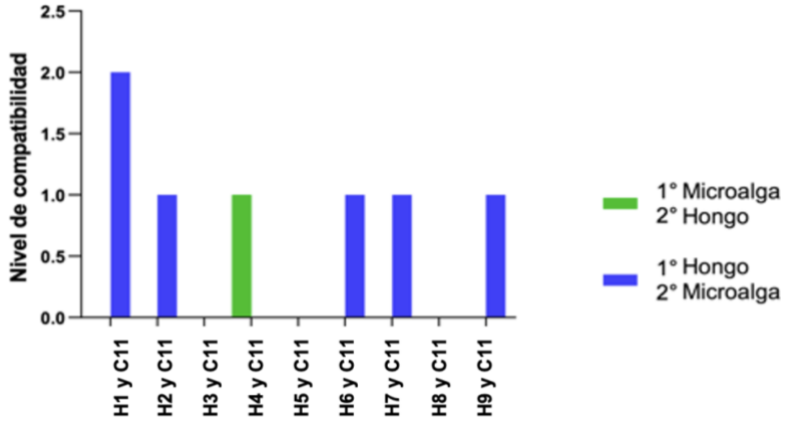
Crecimiento de los hongos filamentosos y Characium (cepa 4)



Sobre el crecimiento de los nueve hongos con la microalga 11, que está compuesta por *Fallacia*, *Fistulifera* y *Pseudococcomyxa*, se observó que sembrar primero los hongos *Penicillium scabrosum* (H1), *Talaromyces francoae* (H2), *Penicillium nothofagi* (H6), *Penicillium pulvillorum* (H7) y *Pseudeurotium zonatum* (H9), seguido de la cepa, favoreció su crecimiento, destacando el hongo 1 como el de mayor desarrollo. En contraste, *Mucor hiemalis* (H4) mostró mejor crecimiento cuando fue sembrado después de la microalga (Figura 31).

Figura 31

Crecimiento de los hongos filamentosos y Fallacia, *Fistulifera* y *Pseudococcomyxa (cepa 11)*



A continuación, se presentan las imágenes que muestran el crecimiento de los hongos *Penicillium scabrosum* (H1), *Penicillium nothofagi* (H6) y *Neurospora crassa* (H8) con *Pseudococcomyxa* (microalga 3), así como del hongo 1 con la microalga 11, tras 16 días de incubación a 16 °C. Se confirma que, en la mayoría de los casos, el crecimiento fue más favorable cuando se sembraron primero los hongos 1, 6, 8 y *Pseudeurotium zonatum* (H9), seguidos de las microalgas. La única excepción fue *Mucor hiemalis* (H4), cuyo desarrollo fue mayor cuando se sembró después de la microalga 11 (Figuras 32 y 33).

Estos hallazgos destaca la importancia del orden de inoculación en las interacciones microbianas, lo que podría tener implicancias relevantes para estrategias de biorremediación o desarrollo de consorcios microbianos en ambientes mineros.

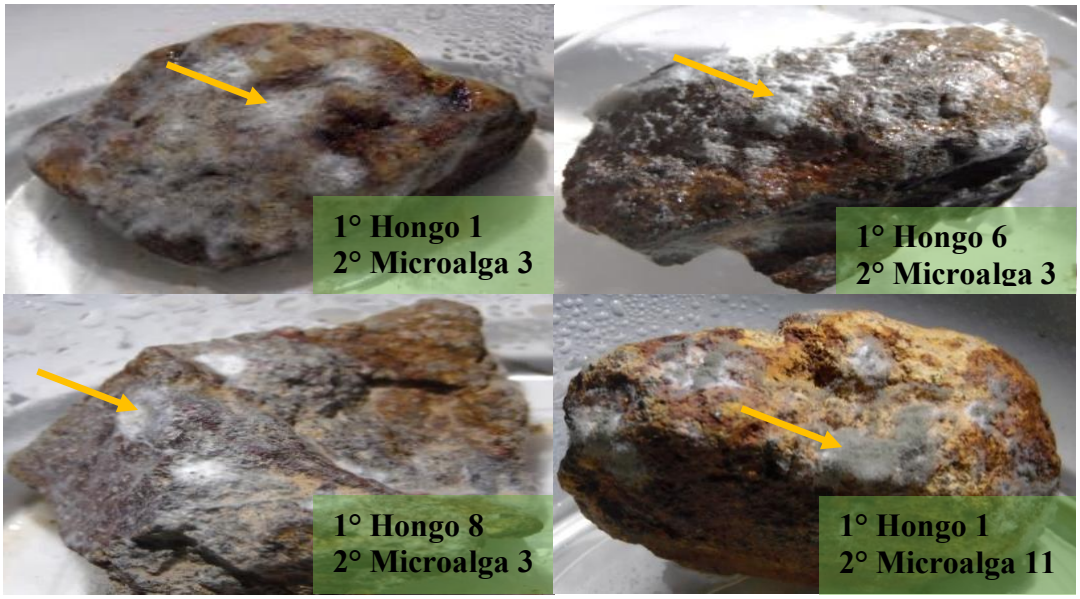
Figura 32

Crecimiento del Pseudeurotium zonatum (H9) sobre las rocas con Pseudococcomyxa (microalga 3).



Figura 33

Crecimiento de Penicillium scabrosum (H1), Penicillium nothofagi (H6) y Neurospora crassa (H8) con Pseudococcomyxa (microalga 3), y del hongo 1 con la microalga 11.



Medición del pH con inoculación de microalga con Hongos

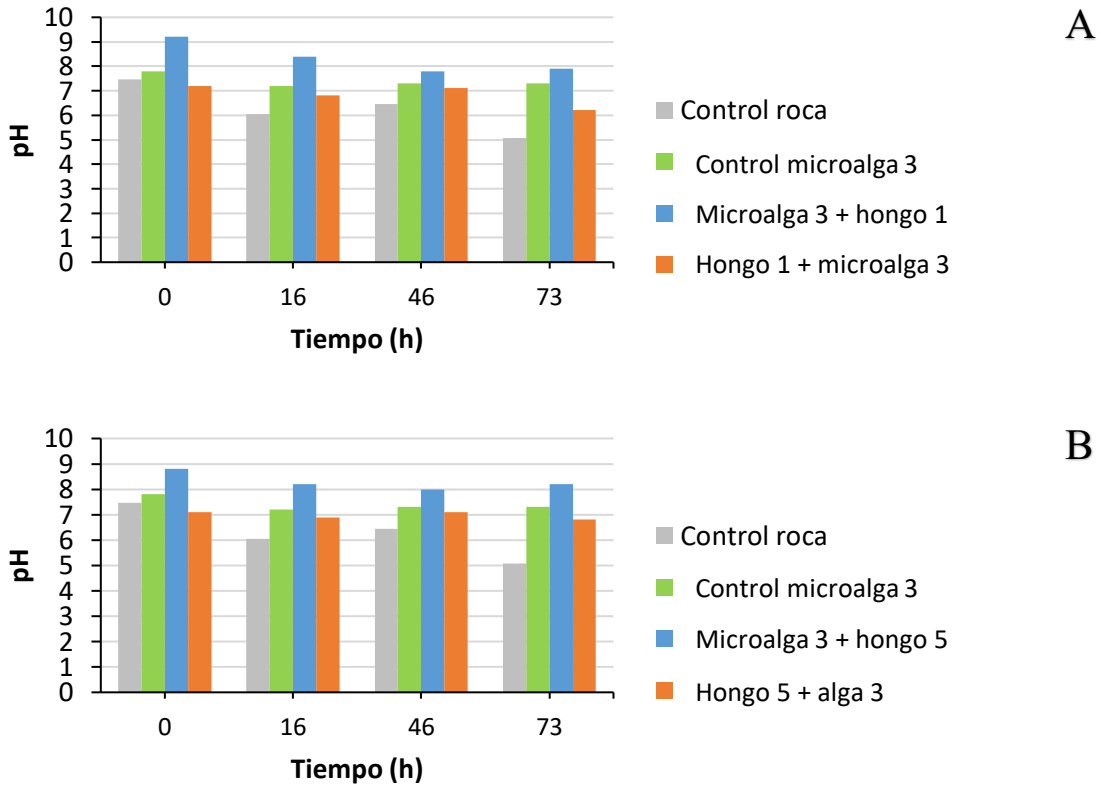
La Figura 34 presenta los datos en gráficos, destacando que las combinaciones de *Penicillium scabrosum* (H1), *Pseudeurotium bakeri* (H5), *Neurospora crassa* (H8) y *Pseudeurotium zonatum* (H9) con *Pseudococcomyxa* (microalga 3) generaron pH entre 6.2 y 6.9, por lo que no se consideran óptimas. En cambio, la combinación más exitosa fue de la microalga 3 y el hongo 5 (pH 8.2), seguida

por los hongos 8 y 9 (pH 7.9). Se recomienda sembrar primero la microalga 3 y después los hongos 1, 5, 8 y 9, para maximizar el efecto alcalinizante.

La Figura 35 muestra que la combinación de la microalga 11, compuesta por *Fallacia*, *Fistulifera* y *Pseudococcomyxa* con *Pseudeurotium bakeri* (H5) fue la más efectiva, logrando un pH de 8.2, lo que representa el valor más alcalino registrado entre todas las combinaciones evaluadas con esta microalga. Asimismo, la combinación con *Neurospora crassa* (H8) también resultó favorable, alcanzando un pH de 7.1. Cabe destacar que el orden de siembra influye en los resultados: sembrar ambos microorganismos simultáneamente produce un pH más elevado que cuando se inocula primero el hongo y posteriormente la microalga 11, lo cual solo alcanzó un pH de 6.0. Esto sugiere que el orden de inoculación es un factor crítico para optimizar la alcalinización de las rocas.

Figura 34

Medición de pH entre Pseudococcomyxa (microalga 3) y: A. Penicillium scabrosum (Hongo 1). B. Pseudeurotium bakeri (Hongo 5). C. Neurospora crassa (Hongo 8). D. Pseudeurotium zonatum (Hongo 9)



(continuación)

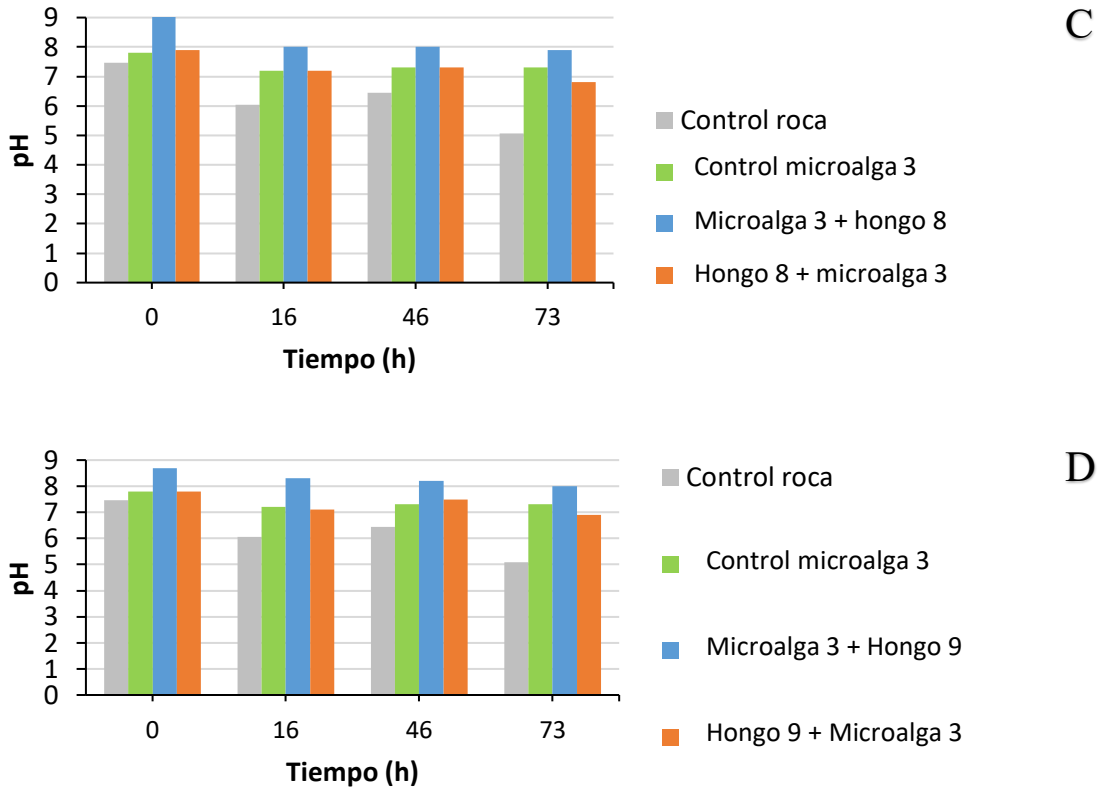
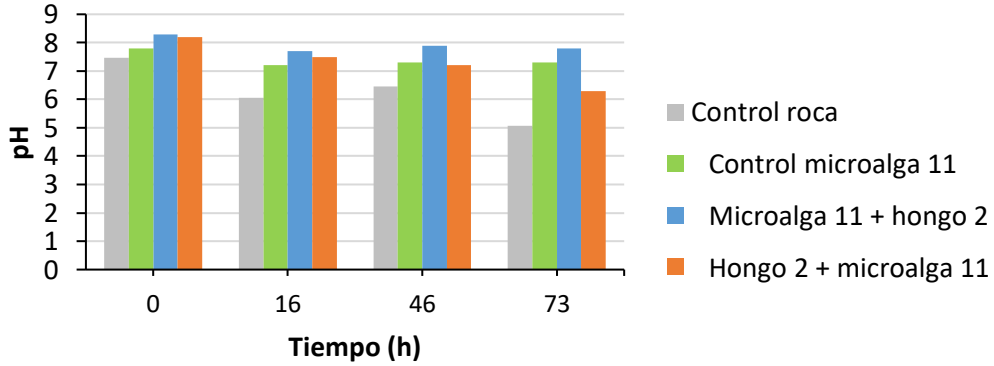


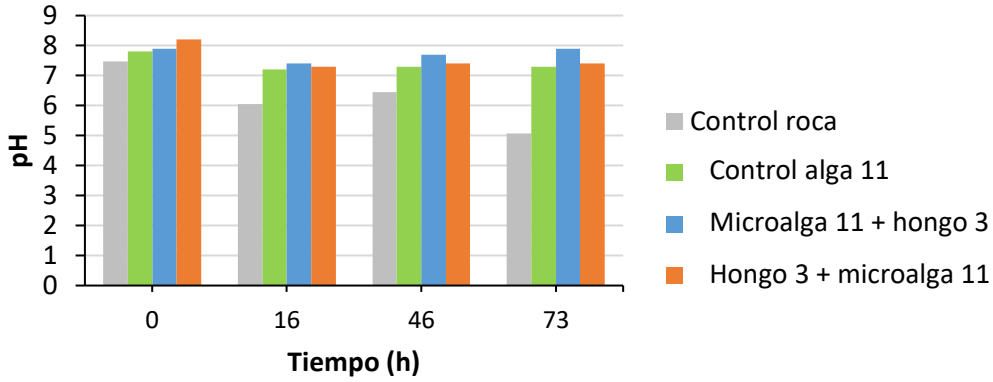
Figura 35

Medición de pH entre la microalga 11 (Fallacia, *Fistulifera* y *Pseudococcomyxa) y: A. Talaromyces francoae (Hongo 2). B. Trichoderma viridescens (Hongo 3). C. Pseudeurotium bakeri (Hongo 5). D. Penicillium pulvillorum (Hongo 7). E. Neurospora crassa (Hongo 8)*

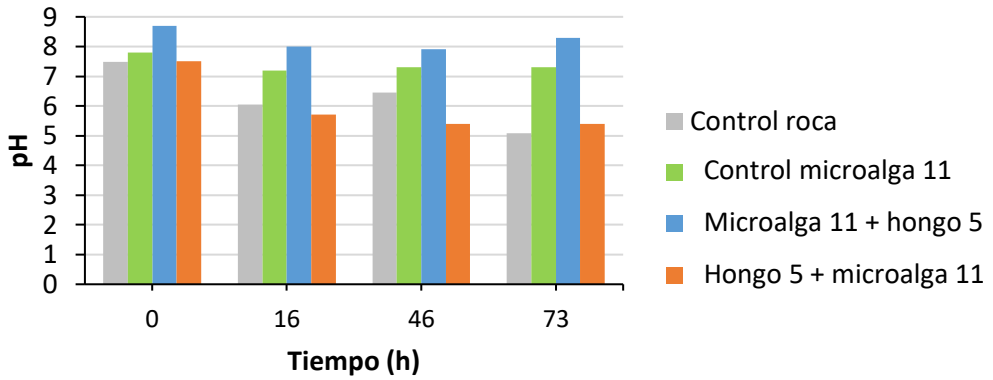


(continuación)

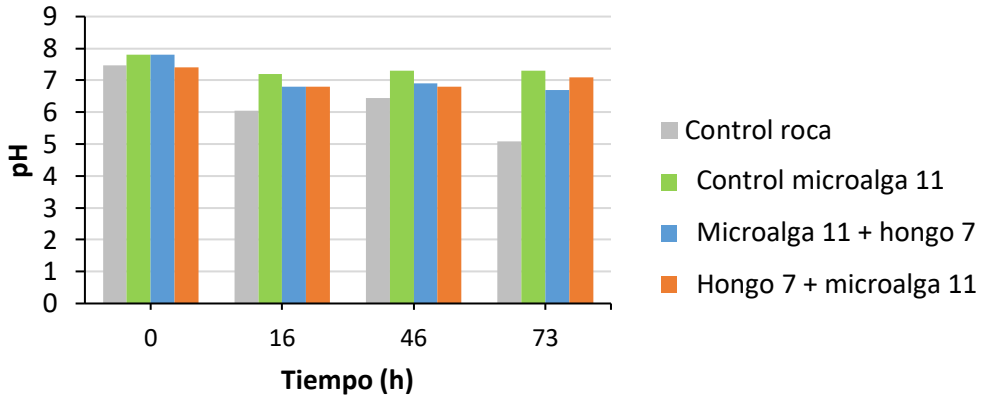
B



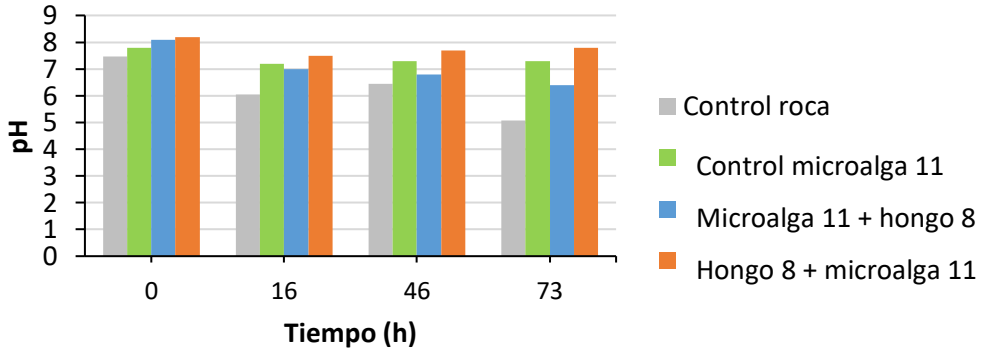
C



D



E



Ensayo sucesión de hongos, cianobacterias/microalgas y bacterias

En este estudio, los tratamientos aplicados mostraron variaciones significativas en los niveles de pH, permitiendo identificar aquellos con mayor eficacia en la neutralización del ambiente ácido. Los tratamientos de sucesión T8 y T6 demostraron ser los más efectivos, logrando un aumento notable del pH. Esta información sugiere una posible sinergia microbiana favorable en la sucesión aplicada, que podría estar relacionada con una mayor actividad metabólica o una mejor adaptación a las condiciones del sustrato rocoso. Le siguieron en efectividad los tratamientos T3 y T5, evidenciando mejoras en los niveles de pH, aunque en menor grado.

Por otro lado, tratamientos no asociados a sucesiones, como T13, T11, T9 y T12, también mostraron incrementos significativos del pH. Estos datos son relevantes por representar alternativas más simples y económicas para su aplicación en terreno, reduciendo la complejidad del diseño de sucesiones sin perder efectividad. En este sentido, su incorporación en futuros diseños experimentales o pruebas piloto podría contribuir a la optimización de recursos y a la implementación más viable de estrategias microbianas en entornos mineros (Tabla 18).

Estos hallazgos respaldan de que ciertos consorcios microbianos, tanto en sucesión como en tratamientos individuales, pueden modificar favorablemente el pH del sustrato rocoso, contribuyendo al control de la acidez y al desarrollo de estrategias sostenibles de remediación.

Tabla 18

Tratamientos propuestos de sucesión de los microorganismos

N°	Nombre del tratamiento	pH inicial	pH final día 19	Diferencia del pH
1	Suelo + m.o (L1, OB2, OA2, OP1, UA3) + semillas de trebol	3.8	5.5	1.7
2	Sucesión 1: Microalga 4 + Hongo 7 + UA3	7.3	7.5	0.2
3	Sucesión 2: Microalga 4 + Hongo 2 + UA3	4.0	7.5	**3.5**
4	Sucesión 3: Microalga 11 + Hongo 3 + UA3	5.6	7.5	1.9
5	Sucesión 4: Microalga 11 + Hongo 5 + UA3	4.6	7.6	**3.0**
6	Sucesión 5: Microalga 4 + Hongo 6 + UA3	3.6	7.5	**3.9**
7	Sucesión 6: Microalga 11 + Hongo 1 + UA3	5.0	7.8	2.8
8	Sucesión 7: Hongo 5+ Microalga 3 + UA3	3.7	7.8	**4.1**
9	Microalga 11	5.3	9.1	**3.8**
10	Microalga 10	3.9	5.2	1.3
11	Bacteria L4	2.9	6.8	**3.9**
12	Consorcio de bact. formadoras de *biofilm* (OP1 yUA3)	3.6	7.2	**3.6**
13	Bioaumentación (melaza 2 %)	2.9	6.9	**4.0**
14	Control: Agua de bramadero sin esterilizar	3.6	3.9	0.3

Nota. Se utilizaron las siguientes especies para el ensayo: Candida tropicalis (L1), Serratia sp. (OB2, OP1), Acinetobacter septicus (OA2), Pandoraea terrigena (UA3), Serratia quinivorans (L4), Penicillium scabrosum (H1), Talaromyces francoae (H2), Trichoderma viridescens (H3), Pseudeurotium bakeri (H5), Penicillium nothofagi (H6), Penicillium pulvillorum (H7), Pseudococcomyxa (microalga 3), Characiun (microalga 4), Characium, Chlorella (microalga 10), Fallacia, Fistulifera y Pseudococcomyxa (microalga 11),

No obstante, al realizar un seguimiento diario de los tratamientos, se observaron variaciones dinámicas en la evolución del pH. La sucesión 3 mostró una tendencia hacia la acidificación progresiva con el paso del tiempo, lo que podría indicar una actividad microbiana que favorece la generación de compuestos ácidos o la oxidación de minerales sulfurosos. En contraste, la sucesión 5 evidenció un incremento sostenido del pH a lo largo de los días, sugiriendo un efecto neutralizante más estable.

La sucesión 6 presentó un comportamiento constante, sin variaciones significativas en el pH, lo cual puede interpretarse como una estabilidad funcional del consorcio sin una influencia marcada en la modificación de la acidez. Por su parte, la sucesión 7 mostró inicialmente un aumento del pH, seguido de un descenso, reflejando posiblemente una actividad metabólica inicial favorable que luego fue limitada por las condiciones del medio.

Un patrón similar se detectó en algunos tratamientos individuales, particularmente en *Fallacia*, *Fistulifera* y *Pseudococcomyxa* (microalga 11), la cepa bacteriana *Serratia quinivorans* (L4), y la combinación de *Serratia sp.* (OP1) y *Pandoraea terrigena* (UA3). Estos tratamientos mostraron un comportamiento oscilante, con aumentos iniciales de pH seguidos por descensos, lo que podría asociarse a una pérdida de viabilidad celular, agotamiento de nutrientes o competencia microbiana en etapas posteriores del experimento.

Cabe señalar que en algunas secciones la disponibilidad de literatura científica es limitada, debido a que el presente estudio aborda un enfoque relativamente novedoso, con escasa investigación previa publicada. Esta falta de antecedentes similares no solo refuerza la originalidad del trabajo, sino que también evidencia la necesidad de profundizar en este campo mediante nuevos estudios que amplíen el marco teórico existente.

Figura 36

Tratamientos propuestos de sucesión de los microorganismos

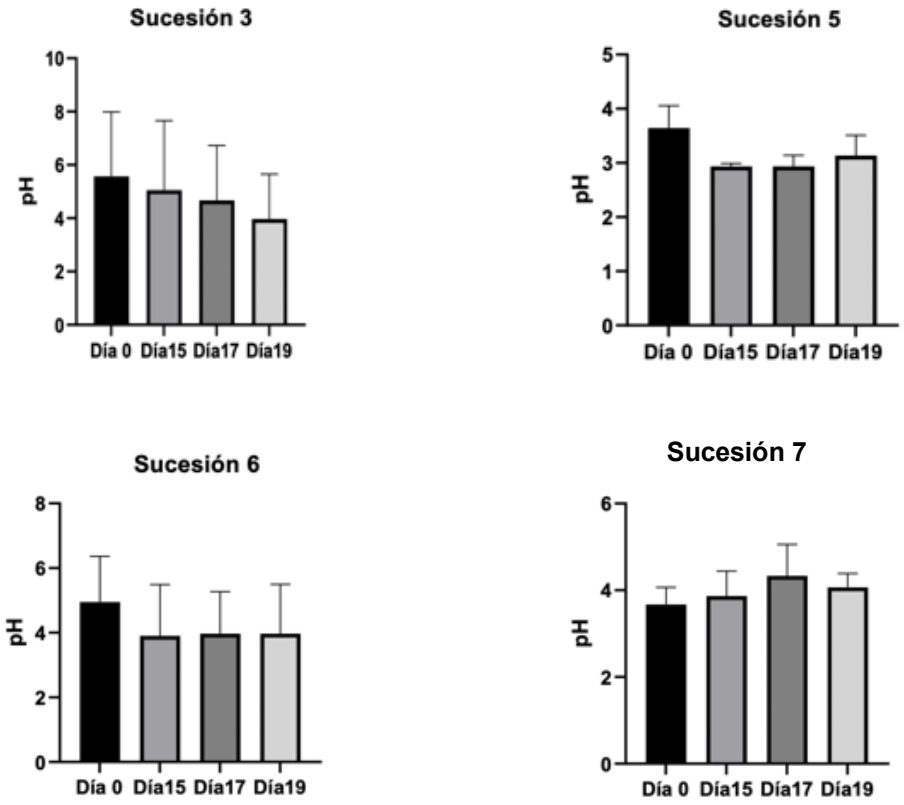
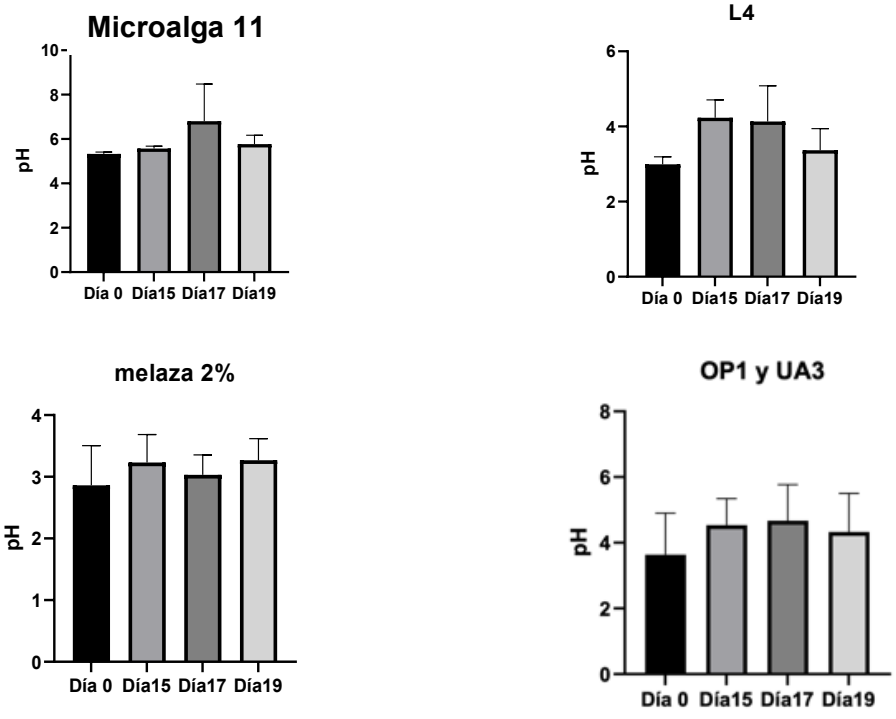


Figura 37

Tratamientos individuales o grupales propuestos



V. Conclusiones

Se evidenció que los suelos prístinos presentan menor diversidad bacteriana, con predominancia de géneros como *Acidobacterium* y *Nitrosovibrio*, asociados a funciones ecológicas clave. En cambio, los tecnosuelos mostraron mayor riqueza, atribuida a la adición de enmiendas y revegetación. Mientras que, en hongos, *Mortierella* es el género más común en todas las muestrasdel suelos, siendo el único que superó el 1 %.

Los tajos de roca ferruginosa son considerados ecosistemas extremos; pobres en nutrientes, expuestos a la radiación UV y a la formación de aguas ácidas que limitan el crecimiento de la mayoría de los microorganismos.

Se identificó y se propuso un consorcio microbiano con capacidad formadora de *biofilm*, aislado a partir de ambientes mineros y validado mediante ensayos *in vitro*, demostrando que los microorganismos seleccionados no solo forman *biofilm* de manera individual, sino que presentan un comportamiento sinérgico en condiciones de consorcio, favoreciendo una estructura multicelular más resistente. Estos resultados obtenidos sugieren un alto potencial de aplicación del consorcio microbiano en procesos como la biorremediación de ambientes contaminados con DAM, o la pasivación de metales pesados mediante *biofilm*s estables.

Los ensayos preliminares con melaza y sucesión microbiana fueron diseñados con el objetivo de optimizar y reducir los procedimientos experimentales, actuando como pruebas piloto previas a su implementación. Estas evaluaciones permitieron analizar la viabilidad técnica y económica de las estrategias propuestas, facilitando un escalamiento más eficiente y fundamentado, y al mismo tiempo, sentar una base sólida para futuras investigaciones orientadas a aplicar el consorcio microbiano en condiciones operativas reales.

VI. Recomendaciones

- Si bien los resultados fueron prometedores, se reconoce la necesidad de estudios complementarios que profundicen en la caracterización genética del consorcio, su estabilidad bajo condiciones extremas y su eficiencia funcional en sustratos reales. Esta investigación representa un paso inicial hacia el diseño de soluciones biotecnológicas sostenibles y adaptadas a los desafíos ambientales actuales de la minería.

- Se sugiere ampliar la caracterización molecular del consorcio microbiano, implementando técnicas de secuenciación de alto rendimiento o qPCR para determinar con mayor precisión la composición y dinámica del consorcio *in situ* a lo largo del tiempo.

- Es recomendable realizar ensayos que sometan al consorcio a diferentes tipos de estrés ambiental (temperatura, pH, concentración de nutrientes o presencia de inhibidores) para validar su robustez y aplicabilidad en escenarios reales. Una vez validado, el consorcio podría probarse en aplicaciones prácticas como biorremediación, control biológico, tratamiento de aguas residuales o procesos industriales, lo cual requiere ensayos funcionales adaptados a cada contexto.

- Sería útil ampliar el muestreo y aislamiento de microorganismos provenientes de ambientes extremos o contaminados, que podrían ofrecer nuevas características funcionales únicas.

- Es importante evaluar la tolerancia del *biofilm* a altas concentraciones de Fe, Cu, Zn, As, entre otros, que suelen encontrarse en residuos mineros, para asegurar su funcionalidad en condiciones contaminadas.

- Finalmente, se sugiere planificar ensayos en condiciones semi-controladas o a escala piloto en parcelas mineras experimentales, para validar el comportamiento del *biofilm* y su impacto real en el entorno.

VII. Referencias bibliográficas

Abarenkov, K., Nilsson, R. H., Larsson, K. H., Taylor, A. F., May, T. W., Frøslev, T. G., ... & Kõljalg, U. (2024). The UNITE database for molecular identification and taxonomic communication of fungi and other eukaryotes: sequences, taxa and classifications reconsidered. Nucleic Acids Research, 52(D1), D791-D797.

Acuña Bernal, F. A. (2023). Aproximación conceptual y legislativa sobre los pasivos ambientales mineros: panorama regional y nacional.

Ahmed, B., Jailani, A., Lee, J. H., & Lee, J. (2022). Inhibition of growth, biofilm formation, virulence, and surface attachment of Agrobacterium tumefaciens by cinnamaldehyde derivatives. Frontiers in Microbiology, 13, 1001865.

Alam, K., Abbasi, M. N., Hao, J., Zhang, Y., & Li, A. (2021). Strategies for natural products discovery from uncultured microorganisms. Molecules, 26(10), 2977.

Alejos Velázquez, L. P., Aragón Martínez, M. del C., & Cornejo Romero, A. (2014). Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos: extracción y purificación de ADN.

Amprayn, K., Rose, M. T., Kecskés, M. L., Pereg, L., Nguyen, H. T., & Kennedy, I. R. (2012). Plant growth promoting characteristics of soil yeast *Candida tropicalis* HY and its effectiveness for promoting rice growth. *Applied Soil Ecology, 61*, 295–299. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2011.11.006

Anderson, I., Held, B., Lapidus, A., Nolan, M., Lucas, S., Tice, H., ... & Kyrpides, N. C. (2012). Genome sequence of the homoacetogenic bacterium Holophaga foetida type strain (TMBS4 T). Standards in genomic sciences, 6, 174-184

Arvi, M., Singh, A., Patel, D., & Chen, L. (2024). Advances in structural genomics: Integrating AI-based modeling with experimental biology. Frontiers in Molecular Biosciences, 11, 1265432. https://doi.org/10.3389/fmolb.2024.1265432

Azeem, K., Fatima, S., Ali, A., Ubaid, A., Husain, F. M., & Abid, M. (2025). Biochemistry of bacterial biofilm: Insights into antibiotic resistance mechanisms and therapeutic intervention. *Life*, *15*(1), 49. https://doi.org/10.3390/life15010049researchgate.net+2mdpi.com+2ouci.dntb.gov.ua+2

Barral-Fraga, L., Martiñá-Prieto, D., Barral, M. T., Morin, S., & Guasch, H. (2018). Mutual interaction between arsenic and biofilm in a mining impacted river. *The Science of the Total Environment*, *636*, 985–998. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.287

Bartlett, J. M. S., & Stirling, D. (2003). *A short history of the polymerase chain reaction*. En J. M. S. Bartlett & D. Stirling (Eds.), *PCR Protocols* (Vol. 226, pp. 3–6). Humana Press. doi:10.1385/1-59259-384-4:3

Bayramoğlu, G., Tuzun, I., Celik, G., Yilmaz, M., & Arica, M. Y. (2006). Biosorption of mercury (II), cadmium (II) and lead (II) ions from aqueous system by microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* immobilized in alginate beads. International Journal of Mineral Processing, 81(1), 35-43.

Belley, P. A., Blowes, D. W., Ptacek, C. J., & Jambor, J. L. (2022). Bioremediation of acid mine drainage: A review of current status and emerging technologies. Environmental Reviews, 30(1), 1–15. https://doi.org/10.1139/er-2021-0030

Berleman, J. E., & Kirby, J. R. (2009). *Deciphering the hunting strategy of a bacterial wolfpack*. Microbial Ecology, 57(3), 514–522. https://doi.org/10.1007/s00248-009-9541-1

Blanco-Vargas, A., Rodríguez-Gacha, L. M., Sánchez-Castro, N., Garzón-Jaramillo, R., Pedroza-Camacho, L. D., Poutou-Piñales, R. A., ... & Pedroza-Rodríguez, A. M. (2020). Phosphate-solubilizing Pseudomonas sp., and *Serratia* sp., co-culture for Allium cepa L. growth promotion. Heliyon, 6(10).

Bobadilla-Fazzini, R. A., & Poblete-Castro, I. (2021). Biofilm formation is crucial for efficient copper bioleaching from bornite under mesophilic conditions: unveiling the lifestyle and catalytic role of sulfur-oxidizing bacteria. Frontiers in Microbiology, 12, 761997.

Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C., Al-Ghalith, G. A., ... & Caporaso, J. G. (2018). QIIME 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science (No. e27295v1). PeerJ Preprints.

Borah, D., Agarwal, K., Khataniar, A., Konwar, D., Gogoi, S. B., & Kallel, M. (2019). A newly isolated strain of *Serratia* sp. from an oil spillage site of Assam shows excellent bioremediation potential. 3 Biotech, 9, 1-12.

Britannica, T. Editors of Encyclopaedia. (2025). *Prokaryote*. In *Encyclopaedia Britannica*. https://www.britannica.com/science/prokaryote

Brown, A., Amunts, A., Bai, X. C., & Scheres, S. H. W. (2014). Ribosome structure and function in protein synthesis. *Annual Review of Biochemistry*, *83*, 1–28. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035340

Buetti-Dinh, A., Herold, M., Christel, S. *et al*. (2020). Systems biology of acidophile biofilms for efficient metal extraction. Sci Data 7, 215 https://doi.org/10.1038/s41597-020-0519-2

Bunyan, I. A. (2020). Molecular study of some Virulence factors and antimicrobial susceptibility pattern of Citrobacter frundii isolated from Human Diarrhea. Sys Rev Pharm, 11, 195-201.

Castellano Sanchez, C. A., Maque Vilca, A., & Jun, Y. (2020). Proyecto de ampliación de operaciones para incrementar la capacidad de producción de una pequeña mina subterranea.

Castellari, C. C., Valle, F. J. M., & Pacin, A. M. (2021). Interacciones entre *Fusarium verticillioides* (Sacc.) *Nirenberg*, *Aspergillus flavus* Link y *Talaromyces funiculosus* en ambientes herméticos. Chilean journal of agricultural & animal sciences, 37(1), 11-20.

Castenholz, R. W. (2001). Cyanobacteria in extreme environments. In B. A. Whitton & M. Potts (Eds.), The ecology of cyanobacteria: Their diversity in time and space. Springer.

Chang, Y., Zhang, Y., Wang, M., Wang, Z., & Zhang, Y. (2024). Identifying sources of acid mine drainage and major hydrogeochemical processes in abandoned mine adits (Southeast Shaanxi, China). Journal of Geochemical Exploration, 258, 107181. https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2023.107181

Chávez Huingo, M. (2024). Diversidad bacteriana cultivable y no cultivable de agua y sedimento en el drenaje ácido de la mina Michiquillay-Cajamarca, 2021.

Chirinos-Arias, M. C. (2015). Guía de PCR en tiempo real. Recuperado el 5 de marzo del 2023, https://www.researchgate.net/profile/Michelle-Chirinos-Arias/publication/283090415_Guia_de_PCR_en_tiempo_real/links/562a738108ae22b17031bd0f/Guia-de-PCR-en-tiempo-real.pdf

Chlebek, D., Grebtsova, V., Piński, A., Żur-Pińska, J., & Hupert-Kocurek, K. (2022). Genetic determinants of antagonistic interactions and the

response of new endophytic strain *Serratia quinivorans* KP32 to fungal phytopathogens. *International Journal of Molecular Sciences, 23*(24), 15561. https://doi.org/10.3390/ijms232415561

Christel, S., Herold, M., Bellenberg, S., El Hajjami, M., Pivkin, I. V., Sand, W., Wilmes, P., Poetsch, A., & Dopson, M. (2017). Multi-omics reveals the lifestyle of the acidophilic, mineral-oxidizing model species *Leptospirillum ferriphilum T*. *Applied and Environmental Microbiology, 84*(3), e02091-17. https://doi.org/10.1128/AEM.02091-17

Clarridge, J.E. (2004) Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Clinical Microbiology Reviews, 17, 840-862. https://doi.org/10.1128/cmr.17.4.840-862.2004

Deng, X., Wei, B., & Hu, Z. L. (2010). Study on the removal of nitrogen and phosphorus from wastewater by *Chlamydomonas reinhardtii*. Huan Jing ke Xue= Huanjing Kexue, 31(6), 1489-1493.

Díaz-Sánchez, Á., Melchor-Martínez, E. M., & Rodríguez-Montelongo, L. E. (2020). Advances in ligninolytic enzyme production by fungi and their biotechnological applications. *Biotechnology Progress, 36*(1), e2934. https://doi.org/10.1002/btpr.2934

Diebold, P. J., Rhee, M. W., Shi, Q., Trung, N. V., Umrani, F., Ahmed, S., ... & Brito, I. L. (2023). Clinically relevant antibiotic resistance genes are linked to a limited set of taxa within gut microbiome worldwide. Nature communications, 14(1), 7366.

Dirección General de Calidad Ambiental del Ministerio del Ambiente. Guía para Muestreo de Suelos. RM N° 085-2014-MINAM Lima, Perú. 2014.

Duarte, A. W. F., Dayo-Owoyemi, I., Nascimento, F. X., Coelho, A. S. G., Araújo, F. A. L., Barbosa, R. N., ... & Rosa, C. A. (2018). Fungal communities in

Antarctic soil along vertical profiles of active layer and permafrost. *Fungal Ecology, 35*, 22–31. https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.06.005

Escandón Astudillo, M. A., & Peña Dután, M. G. (2022). Formación de biopelículas y mecanismo de quorum sensing como estrategia de resistencia microbiana-revisión bibliográfica.

Fadiji, A. E., & Babalola, O. O. (2020). Metagenomics methods for the study of plant-associated microbial communities: a review. Journal of microbiological methods, 170, 105860.

Fierro, F. F. (2014). Electroforesis de ADN. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*, *27*. Recuperado el 1 de marzo del 2023, http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/electroforesis.pdf

Figueiredo, M. A., da Silva, T. H., Pinto, O. H. B., Leite, M. G. P., de Oliveira, F. S., Messias, M. C. T. B., Rosa, L. H., Câmara, P. E. A. S., Lopes, F. A. C., & Kozovits, A. R. (2023). Metabarcoding of Soil Fungal Communities in Rupestrian Grassland Areas Preserved and Degraded by Mining: Implications for Restoration. Microbial ecology, 85(3), 1045–1055. https://doi.org/10.1007/s00248-023-02177-y

Flemming, H.-C., & Wuertz, S. (2019). Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 17(4), 247–260. https://doi.org/10.1038/s41579-019-0158-9

Fortin, D., Ferris, F. G., & Beveridge, T. J. (1997). Surface-mediated mineral development by bacteria. En J. F. Banfield & K. H. Nealson (Eds.), *Geomicrobiology: Interactions between microbes and minerals* (pp. 368–393). Reviews in Mineralogy, Mineralogical Society of America.

Frisvad, J.C., Larsen, T.O., & de Vries, R.P. (2018). Filamentous fungi from extreme environments produce diverse secondary metabolites with

biological activities. *Fungal Biology Reviews*, 32(3), 147-162. https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.12.001

Gadd, G. M. (2017). Geomicology: The biogeochemical transformation of rocks, minerals, metals and radionuclides by microorganisms. Microbiology Spectrum, 5(4). https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MGM2-0013-2016

Gagnon, V., Rodrigue-Morin, M., Tremblay, J., Wasserscheid, J., Champagne, J., Bellenger, J. P., ... & Roy, S. (2020). Vegetation drives the structure of active microbial communities on an acidogenic mine tailings deposit. PeerJ, 8, e10109.

Galindo-Alcázar, O., Medina-Jaritz, N. B., Garduño-Solórzano, G., & Olvera-Ramírez, R. (2018). *Cianobacterias y microalgas de biopelículas superficiales de la zona arqueológica de Malinalco, México*. Polibotánica, 45, 131–146.

Gantar, M., & Elhai, J. (1999). *Cyanobacterial mats: Formation and ecological roles*. In B.A. Whitton (Ed.), *The ecology of cyanobacteria: Their diversity in time and space*. Kluwer Academic Publishers.

Gao, K., & Garcia-Pichel, F. (2011). Microbial adaptations to extreme environments: a potential for bioremediation. *Journal of Applied Phycology*, 23(1), 1–15.

García, J. A., Herazo, L. C. S., Cuevas, F. D. M., & Meza, A. E. R. (2021). Bacterias benéficas en aguas residuales porcinas tratadas en humedales artificiales. Innovación Tecnológica, 1.

Gardes M. & T D Bruns (1993) ITS primers with enhanced specificity for basiodiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. Molec. Ecol. 2:113-118.

Gaytán, P. C., & Núñez, I. M. (2022). Minería y resistencias socioambientales en México. posgrado, 116.

González, C., Rodríguez, F., & Martínez, J. (2015). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *33*(4), 238–245. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.11.012

González Fontecha, J. E., & Patiño Herrera, A. Y. (2022). Evaluación de los factores bióticos y abióticos en una cría de planarias.

Gunde-Cimerman, N., Zalar, P., de Hoog, G. S., & Plemenitaš, A. (2018). Fungi in Extreme Environments. *Current Opinion in Microbiology, 43*, 44–49. https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.11.003

Gu, Y., Guberman-Pfeffer, M. J., Srikanth, V., Shen, C., Giska, F., Gupta, K., ... & Malvankar, N. S. (2023). Structure of Geobacter cytochrome OmcZ identifies mechanism of nanowire assembly and conductivity. Nature microbiology, 8(2), 284-298.

Han, S., Yang, S., Tang, R., Xie, C. J., Liu, G. H., & Zhou, S. G. (2023). Geothrix fuzhouensis sp. nov. and Geothrix paludis sp. nov., two novel Fe (III)-reducing bacteria isolated from paddy soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 73(5), 005898.

Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R., & Peterson, S. B. (2010). Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nature Reviews Microbiology*, 8(1), 15–25. https://doi.org/10.1038/nrmicro2259

Hoque, E., & Fritscher, J. (2019). Multimetal bioremediation and biomining by a combination of new aquatic strains of *Mucor hiemalis.* Scientific Reports, 9(1), 10318.

Houbraken, J., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2011). *Penicillium nothofagi. Studies in Mycology*, 68, 1–6. https://doi.org/10.3114/sim.2011.68.01

Hou, Y., Zhao, Y., Lu, J., Wei, Q., Zang, L., & Zhao, X. (2023). Environmental contamination and health risk assessment of potentially toxic trace metal elements in soils near gold mines–a global meta-analysis. Environmental Pollution, 330, 121803.

Invitrogen. (2005). Nucleic acid purification and quantification sourcebook. Invitrogen Industries, EE.UU.

Jacquiot E, D van Tuinen, S Gianinazzi, V Gianinazzi-Pearson (2000). Monitoring species of arbuscular mycorrhizae fungi in planta and in soil by nested PCR: application to the study of the impact of sewage sludge. Plant and Soil 226:179-188.

Jiao, Y., Zhang, C., Su, P., Tang, Y., Huang, Z., & Ma, T. (2023). *A review of acid mine drainage: Formation mechanism, treatment technology, typical engineering cases and resource utilization*. Process Safety and Environmental Protection, 170, 1240–1260. https://doi.org/10.1016/j.psep.2022.12.028

Johnson JS, Spakowicz DJ, Hong BY, Petersen LM, Demkowicz P, Chen L, Leopold SR, Hanson BM, Agresta HO, Gerstein M, Sodergren E, Weinstock GM. (2019). Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. Nature communications, 10(1), 5029. doi: 10.1038/s41467-019-13036-1. PMID: 31695033; PMCID: PMC6834636.

Kauserud, H. (2023). ITS alchemy: on the use of ITS as a DNA marker in fungal ecology. Fungal Ecology, 65, 101274.

Kim, N., & Park, D. (2022). Biosorptive treatment of acid mine drainage: a review. International Journal of Environmental Science and Technology, 19(9), 9115-9128

Kislichkina, A. A., *et al*. (2024). Evaluation of 16S rRNA genes sequences and genome-based analysis for identification of non-pathogenic Yersinia. Frontiers in Microbiology, 15, 1519733. PMC+2PubMed+2Frontiers+2

Kobayashi, H., Tanaka, T., Suzuki, Y., & Nakamura, K. (2022). Microbial adhesion and biofilm formation on rough surfaces: A review. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 823651. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.823651

Koczan, J. M., *et al*. (2009). Quantitative and qualitative evaluation of biofilm formation by clinical isolates. *Journal of Microbiological Methods*, 76(3), 341-347. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.10.017

König, L. A., Medina-Vega, J. A., Longo, R. M., Zuidema, P. A., & Jakovac, C. C. (2023). Restoration success in former Amazonian mines is driven by soil amendment and forest proximity. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 378(1867), 20210086.

Koops, H. P., & Pommerening-Röser, A. (2015). Nitrosovibrio. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, 1-2

Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2017). *MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets*. Molecular Biology and Evolution, 33(7), 1870–1874. https://doi.org/10.1093/molbev/msw054

Kuo, M. (2015). Sphaerosporella brunnea. MushroomExpert.com. Recuperado de https://www.mushroomexpert.com/sphaerosporella_brunnea.html

Lagos-Burbano, E., & Castro-Rincón, E. (2019). Caña de azúcar y subproductos de la agroindustria azucarera en la alimentación de rumiantes. Agronomía Mesoamericana, 917-934.

Lauritano, C., & Galasso, C. (2023). Microbial interactions between marine microalgae and fungi: From chemical ecology to biotechnological possible applications. Marine Drugs, 21(5), 310.

Lei, L. R., Gong, L. Q., Jin, M. Y., Wang, R., Liu, R., Gao, J., ... & Deng, Y. (2022). Research advances in the structures and biological activities of secondary metabolites from *Talaromyces*. Frontiers in Microbiology, 13, 984801.

Li, D., Yin, N., Xu, R., Wang, L., Zhang, Z., & Li, K. (2021). Sludge amendment accelerating reclamation process of reconstructed mining substrates. Scientific Reports, 11(1), 2905.

Li, F., Zhang, Y., & Zhang, X. (2024). Diverse interactions between bacteria and microalgae: A review for enhancing harmful algal bloom mitigation and biomass processing efficiency. *Environmental Microbiology Reports*, 16(3), 345–359. https://doi.org/10.1111/1758-2229.13023

Li, Y., Guo, L., Häggblom, M. M., Yang, R., Li, M., Sun, X., Chen, Z., Li, F., Su, X., Yan, G., Xiao, E., Zhang, H., & Sun, W. (2022). *Serratia* spp. Are Responsible for Nitrogen Fixation Fueled by As(III) Oxidation, a Novel Biogeochemical Process Identified in Mine Tailings. Environmental science & technology, 56(3), 2033–2043. https://doi.org/10.1021/acs.est.1c06857

Li, Y., Guo, L., Yang, R., Yang, Z., Zhang, H., Li, Q., ... & Sun, W. (2023). Thiobacillus spp. and Anaeromyxobacter spp. mediate arsenite oxidation-dependent biological nitrogen fixation in two contrasting types of arsenic-contaminated soils. Journal of hazardous materials, 443, 130220.

Liu, X., He, L., Zhang, X., Kong, D., Chen, Z., Lin, J., & Wang, C. (2022). Bioremediation of petroleum-contaminated saline soil by *Acinetobacter* baumannii and *Talaromyces* sp. and functional potential analysis using metagenomic sequencing. Environmental Pollution, 311, 119970.

Liu, Y., Zhang, Y., & Wang, Y. (2015). Screening and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from rhizosphere soil of maize. *Environmental Science and Pollution Research, 22*(19), 14643–14651. https://doi.org/10.1007/s11356-015-4671-2

Lodish, H. F., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2006). Molecular cell biology (Vol. 4). New York: WH Freeman and company.

Lozano Teruel, J. A. (2005). Bioquímica y biología molecular para ciencias de la salud (No. Nc670). McGraw-Hill.

Ludwig, L. S., & Spielmann, M. (2022). Functional genomics: From basic mechanisms to disease biology. Nature Reviews Genetics, 23(5), 275–290. https://doi.org/10.1038/s41576-022-00480-2

Luna, H. (2011). Minería subterránea y superficial y beneficio de minerales en el Perú. Ministerio de Energía y Minas. Recuperado el 08 de agosto del 2022 http://www.minem.gob.pe

Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2021). *Brock biology of microorganisms* (15th ed.). Pearson.

Madigan M; Martinko J (editors). (2005). Brock Biology of Microorganisms (11th ed. edición). Prentice Hall. ISBN 0-13-144329-1.

Madline, A., Benidire, L., Pereira, S. I., khalil, H. E., Michalski, A., Castro, P. M. & Boularbah, A. (2025). Optimizing biological and physicochemical properties of acidic mine tailings through combined organo-mineral amendments and topsoil application. Journal of Soils and Sediments, 25(2), 609-624.

Maiti, S. K., & Ahirwal, J. (2019). Ecological restoration of coal mine degraded lands: Topsoil management, pedogenesis, carbon sequestration, and

mine pit limnology. In Phytomanagement of polluted sites (pp. 83-111). Elsevier.

Mayta Ccapa, T. P., Quispe Yucra, R. G., & Tito Luque, A. F. (2023). Diseño experimental del tratamiento secundario con tecnología MBBR para aguas residuales provenientes del camal Municipal de Cotahuasi-La Unión-Arequipa 2022.

Mbareche, H., Veillette, M., Bilodeau, G., & Duchaine, C. (2020). Comparison of the performance of ITS1 and ITS2 as barcodes in amplicon-based sequencing of bioaerosols. PeerJ, 8, e8523. doi: 10.7717/peerj.8523. PMID: 32110484; PMCID: PMC7032056.

Méndez-Tovar, M., García-Meza, J. V., & González, I. (2019). Electrochemical monitoring of Acidithiobacillus thiooxidans biofilm formation on graphite surface with elemental sulfur. *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)*, *128*, 30–38. https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2019.03.004

Miyauchi, K., Ishii, S., & Kuroda, S. (2022). Whole-genome sequence of an arsenite-oxidizing bacterium *Pandoraea* sp. strain NE5 isolated from the rhizosphere of the arsenic hyperaccumulator Pteris vittata. Microbiology Resource Announcements, 11(3), e01234-22. https://doi.org/10.1128/mra.01234-22

Moreno, X., Ventura, M., Panizo, M. M., & Garcés, M. F. (2023). Evaluación de la formación de biopelículas en aislamientos bacterianos y fúngicos por el método semicuantitativo de microtitulación con cristal violeta y el cualitativo de agar con rojo Congo. Biomédica, 43, 77-88.

Mun, H. Y., Jeon, Y. J., & Goh, J. (2020). New record of three *Penicillium* species isolated from the freshwater environment in Korea. The Korean Journal of Mycology, 48(4), 491-498.

Muzio, R. (2024). *Identificación de genes y moléculas involucradas en el antagonismo entre cepas de Gluconacetobacter diazotrophicus*. Universidad Nacional de Quilmes. Recuperado de https://ridaa.unq.edu.ar/bitstream/handle/20.500.11807/5025/TD_2024_muzio_019.pdf

Nayana, K., Sudhakar, M. P., & Arunkumar, K. (2022). Biorefinery potential of *Coelastrella* biomass for fuel and bioproducts—a review. Biomass Conversion and Biorefinery, 1-14.

Ojala, T., Häkkinen, A. E., Kankuri, E., & Kankainen, M. (2023). Current concepts, advances, and challenges in deciphering the human microbiota with metatranscriptomics. Trends in Genetics, 39(9), 686-702.

Oliveira, R., Almeida, C., & Azevedo, N. F. (2020). Detection of microorganisms by fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid. Peptide Nucleic Acids: Methods and Protocols, 217-230.

Oliver, J. P. (2008). Wood decay physiology of the inky cap fungi (Doctoral dissertation, University of Maine).

Oroza, P. I. M., & Larrea, G. A. (2019). La Minería en el Perú de hoy. Veritas, 20(2), 17-19.

Ossa, J. A., Vanegas, M. C. & Badillo, Á. M. (2010). *Evaluación de la melaza de caña como sustrato para el crecimiento de Lactobacillus plantarum*. Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica, 13(1), 97–104.

O'Toole, G. A. (2011). Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of Visualized Experiments*, (47), e2437. https://doi.org/10.3791/2437

Otunola, B., Maboeta, M. S., & Owojori, O. J. (2024). *Global advancements in the management and treatment of acid mine drainage: A review*.

Environmental Advances, 15, 100416. https://doi.org/10.1016/j.envadv.2023.100416

Ozimek, E., & Hanaka, A. (2020). Mortierella species as the plant growth-promoting fungi present in the agricultural soils. Agriculture, 11(1), 7.

Palma Terán, A., & Barcos Arias, M. S. (2022). Microorganismos solubilizadores de fósforo (P) y potasio (K) como alternativa biotecnológica para una agricultura sustentable (Doctoral dissertation, ESPOL. FCV). Recuperado el 20 de septiembre del 2022 https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/55843/1/T-112342%20%20Palma%20Terán.pdf

Pennock, Daniel John. (2019). Soil erosion: the greatest challenge for sustainable soil management. Clara Lefevre, Global Soil Partnership, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy. ISBN 978-92-5-131426-5. OCLC 1104062812.

Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (2021). *Microbiology* (9th ed.). McGraw-Hill Education.

Péñate-Carranza, B., Tamaris-Turizo, C. E., & Luna-Fontalvo, J. A. (2021). Hongos ingoldianos de la parte media del río Gaira, Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, 45(174), 208-216.

Pinto-Figueroa, E. A., Seddon, E., Yashiro, E., Buri, A., Niculita-Hirzel, H., Van der Meer, J. R., & Guisan, A. (2019). Archaeorhizomycetes spatial distribution in soils along wide elevational and environmental gradients reveal co-abundance patterns with other fungal saprobes and potential weathering capacities. Frontiers in microbiology, 10, 656.

Ponce Quiroz, G. M. (2024). Actividad antibacteriana y antifungicida de extractos de algas marinas como indicador para sintetizar compuestos bioactivos de interés terapéutico: una revisión sistemática.

Porter, T. M., & Hajibabaei, M. (2018). Scaling up: A guide to high-throughput genomic approaches for biodiversity analysis. *Molecular Ecology*, *27*(2), 313–338. https://doi.org/10.1111/mec.14478

Prakash, O., Green, S. J., Singh, P., Jasrotia, P., & Kostka, J. E. (2021). Stress-related ecophysiology of members of the genus Rhodanobacter isolated from a mixed waste contaminated subsurface. Frontiers of Environmental Science & Engineering, 15, 1-9.

Qiagen. (2005). BioSprint DNA Plant Handbook. Recuperado el 19 de mayo del 2022, www.qiagen.com/hb/biosprintplantdnakit

Ramakrishnan, R., Singh, A. K., Singh, S., Chakravortty, D., & Das, D. (2022). Enzymatic dispersion of biofilms: An emerging biocatalytic avenue to combat biofilm-mediated microbial infections. Journal of Biological Chemistry, 298(9).

Ramírez, A. (2020). Eficiencia de *Chlorella vulgaris* en la remoción de nitrógeno, fósforo, metales pesados y microorganismos en aguas residuales [Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Puebla]. Repositorio Nacional de Ciencia y Tecnología. https://www.repositorionacionalcti.mx/recurso/oai%3Arepositorioinstitucional.buap.mx%3A20.500.12371/7379

Raven, J. A., Smith, D., Johnson, L., & Pérez, M. (2022). Reviews on microalgae diversity and ecology. *Journal of Phycology*, *58*(4), 567–589. https://doi.org/10.1002/jpy.12345

Rehman, A., Anwar, S., & Niazi, S. B. (2010). Cadmium uptake by yeast, *Candida tropicalis*, isolated from industrial effluents and its potential use in

wastewater clean-up operations. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 26*(10), 1623–1628. https://doi.org/10.1007/s11274-010-0333-2

Reinoso, E. B., Dieser, S. A., & Moliva, M. V. (2022). Manual de herramientas moleculares: conceptos básicos y técnicas empleadas en el estudio de la genética microbiana.

Rincón Lozano, W., & Manzanares Goméz, J. (2020). Reúso de agua residual en explotación minera por socavones (Doctoral dissertation, Escuela Colombiana de Ingeniería Julio Garavito).

Rodríguez, C., & Julca, D. (2020). Gestión Del Cierre De Minas En El Perú: Estudio Técnico-Legal Sobre El Alcance De La Legislación Peruana En El Cierre De Operaciones Mineras. Recuperado el 9 de marzo del 2022, https://repositorio.cepal.org/handle/11362/46076

Rodríguez-Gonzales, A., Zárate-Villarroe, S. G., & Bastida-Codina, A. (2022). Biodiversidad bacteriana presente en suelos contaminados con hidrocarburos para realizar biorremediación. Revista de Ciencias Ambientales, 56(1), 178-208.

Rubio, S., Pacheco-Orozco, R. A., Milena Gómez, A., Perdomo, S., & García-Robles, R. (2020). Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: presente y futuro en la práctica clínica. *Universitas Medica*. Recuperado el 2 de marzo del 2023, http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2011-08392020000200006

Sambrook J., E. F. Fritsch & T. Maniatis. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, EE.UU

Sambrook, J., & Russell, D. W. (2006). *Agarose gel electrophoresis*; *SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis*. En *Cold Spring Harbor Protocols*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sánchez-Espinosa, A. C., Villarruel-Ordaz, J. L., & Maldonado-Bonilla, L. D. (2021). Mycoparasitic antagonism of a *Trichoderma harzianum* strain isolated from banana plants in Oaxaca, Mexico. Biotecnia, 23(1), 127-134.

Sansupa C, Purahong W, Nawaz A, Wubet T, Suwannarach N, Chantawannakul P, Chairuangsri S, Disayathanoowat T. (2022). Living Fungi in an Opencast Limestone Mine: Who Are They and What Can They Do? J Fungi (Basel). Sep 20;8(10):987. doi: 10.3390/jof8100987. PMID: 36294552; PMCID: PMC9604801.

Santamarina-García, G., Yap, M., Crispie, F. *et al*. (2024). Shotgun metagenomic sequencing reveals the influence of artisanal dairy environments on the microbiomes, quality, and safety of Idiazabal, a raw ewe milk PDO cheese. Microbiome 12, 262. https://doi.org/10.1186/s40168-024-01980-0

Sardo, A., Orefice, I., Balzano, S., Barra, L., & Romano, G. (2021). Mini-review: potential of diatom-derived silica for biomedical applications. Applied Sciences, 11(10), 4533.

Sarti, G. C., Cristóbal Miguez, A. E., & Curá, A. J. (2019). Optimización de las condiciones de cultivo para el desarrollo de una biopelícula bacteriana y su aplicación como biofertilizante en Solanum lycopersicum L. var. Río grande. Revista de Protección Vegetal, 34(2).

Schniete, J. K., & Fernández-Martínez, L. T. (2024). Natural product discovery in soil actinomycetes: unlocking their potential within an ecological context. Current Opinion in Microbiology, 79, 102487.

Schwarz, A., Suárez, J. I., Aybar, M., Nancucheo, I., Martínez, P., & Rittmann, B. E. (2020). A membrane-biofilm system for sulfate conversion to elemental sulfur in mining-influenced waters. *The Science of the Total Environment*, *740*(140088), 140088. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140088

Sharahi, J. Y., Azimi, T., Shariati, A., Safari, H., Tehrani, M. K., & Hashemi, A. (2019). Advanced strategies for combating bacterial biofilms. Journal of cellular physiology, 234(9), 14689-14708.

Shi, Y., Lou, K., & Li, C. (2011). Growth promotion effects of the endophyte *Acinetobacter johnsonii* strain 3-1 on sugar beet. *Symbiosis*, 54(3), 159–166. https://doi.org/10.1007/s13199-011-0139-x

Singh, K. N., & Narzary, D. (2023). Diversity and heavy metal tolerance of fungi associated with different coal overburden strata of Tikak Colliery, Assam. Current Microbiology, 80(2), 72.

Smith, J., Lee, A., Kumar, R., & Martinez, P. (2023). Microbial biofilms for heavy metal bioremediation: Mechanisms and applications. *Antibiotics*, *12*(2), 145. https://doi.org/10.3390/antibiotics12020145

Sonagra, A. D., & Dholariya, S. J. (2022). *Electrophoresis*. En StatPearls. StatPearls Publishing. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK576427/

Subba Rao, N. S. 1977. In: Soil Microorganisms and Plant Growth, Oxford & IBH Publishing Co., New Delhi, pp. 254-255.

Suh, S.-O., Maslov, D. A., Molestina, R. E., & Zhou, J. J. (2012). Microbotryozyma collariae gen. nov., sp. nov., a basidiomycetous yeast isolated from a plant bug *Collaria oleosa* (Miridae). *Antonie van Leeuwenhoek*, 102(1), 99–104. https://doi.org/10.1007/s10482-012-9717-z

Supanitsky, A. B., & Zorreguieta, Á. (2022). Estudio sobre formación de biofilms en bacterias del suelo.

Suzuki, S., Hosoe, T., Nozawa, K., Kawai, K. I., Yaguchi, T., & Udagawa, S. I. (2000). Antifungal substances against pathogenic fungi, talaroconvolutins, from *Talaromyces convolutus*. Journal of Natural Products, 63(6), 768-772.

Syed, Z., Sogani, M., Rajvanshi, J., & Sonu, K. (2023). Microbial biofilms for environmental bioremediation of heavy metals: a review. Applied Biochemistry and Biotechnology, 195(9), 5693-5711.

Tripathi, S., Behera, T., & Poluri, K. M. (2022). Biochemical insights into cadmium detoxification mechanism of *Coccomyxa* sp. IITRSTKM4. *Journal of Environmental Chemical Engineering, 10*(4), 108102. https://doi.org/10.1016/j.jece.2022.108102

Usyk, M., Zolnik, C. P., Patel, H., Levi, M. H., & Burk, R. D. (2017). Novel ITS1 fungal primers for characterization of the mycobiome. MSphere, 2(6), 10-1128.

Van Tuinen D, E Jacquot, B Zhao, A Gallote, V Gianinazzi-Pearson (1998). Characterization of root colonization profiles by a microcosm community of arbuscular mycorrhizal fungi using 25S rDNA-targeted nested PCR. Molec. Ecol. 7:879-887.

Vargas-Sacha, H., Soto-Carbajal, D., & Hinojosa-Yzarra, L. A. (2021). Tratamiento de Aguas Ácidas de Mina: Acid Mine Water Treatment. Scientific Research Journal CIDI, 1(2), 175-185.

Vela, A. H., & Centeno-Cuadros, A. (2020). Aplicaciones de las técnicas de ADN ambiental al estudio y conservación de los recursos naturales. MoleQla: revista de Ciencias de la Universidad Pablo de Olavide, 40.

Visagie, C. M., Renaud, J. B., Burgess, K. M., Malloch, D. W., Clark, D., Ketch, L., Urb, M., Louis-Seize, G., Assabgui, R., Sumarah, M. W., & Seifert, K. A. (2016). Fifteen new species of *Penicillium*. *Persoonia*, 37, 243–272. https://doi.org/10.3767/003158516X694602

Wang, P., Jia, S. L., Liu, G. L., Chi, Z., & Chi, Z. M. (2022). Aureobasidium spp. and their applications in biotechnology. Process Biochemistry, 116, 72-83.

Wang, X., Li, Y., Jiang, X., & Zhang, T. (2019). Lignin degradation by *Pandoraea* sp. B-6 under alkaline conditions for bioconversion of lignocellulosic biomass. Frontiers in Microbiology, 10, 2556. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02556

Wang, X., Li, Y., & Zhang, X. (2023). Antibacterial activity and biofilm inhibition of *Chlorella polysaccharides* against aquatic pathogens. *Aquaculture Research, 54*(6), 1890–1902. https://doi.org/10.1007/s10499-023-01229-x

Wei, Q., & Ma, LZ. (2013). Biofilm matrix and its regulation in Pseudomonas aeruginosa. International Journal of Molecular Sciences. doi:10.3390/ijms141020983.

Whitton, B. A. (Ed.). (2012). Ecology of cyanobacteria II: their diversity in space and time. Springer Science & Business Media.

Wiest, A. L., Smith, J. D., & González, M. R. (2022). Secondary metabolites of *Trichoderma* species: Peptaiboles, gliotoxins, and their antimicrobial activities. *Journal of Fungal Biology*, 18(3), 245–260. https://doi.org/10.1016/j.jfunbio.2022.04.005

Willems, A., & Gillis, M. (2015). Acidovorax. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, 1-16.

Wu, L., Ning, D., Zhang, B., Li, Y., Zhang, P., Shan, X., ... & Zhou, J. (2019). Global diversity and biogeography of bacterial communities in wastewater treatment plants. Nature microbiology, 4(7), 1183-1195.

Xu, C., Zhang, X., Huang, S., Yan, S., & Li, J. (2024). Identifying dominant spoilage fungal species and preservative treatments for extending shelf life of whole lotus rhizomes at 4° C. LWT, 201, 116263.

Yang, J., Johnson, G. I., Chen, S., & Shuey, L. S. (2021). *A diagnostic guide for Volutella blight affecting Buxaceae*. *Plant Health Progress*, 22(3), 245–252. https://doi.org/10.1094/PHP-02-21-0052-DG

Yao, X., Guo, H., Zhang, K., Zhao, M., Ruan, J., & Chen, J. (2023). *Trichoderma* and its role in biological control of plant fungal and nematode disease. Frontiers in microbiology, 14, 1160551.

Ye, J. C., Zhao, Q. S., Liang, J. W., Wang, X. X., Zhan, Z. X., Du, H., Cheng, J. L., Xiang, L., Feng, N. X., *et al*. (2023). Bioremediation of aniline aerofloat wastewater at extreme conditions using a novel isolate Burkholderia sp. WX-6 immobilized on biochar. Journal of hazardous materials, 456, 131668. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131668

Zhang, T., Wang, N. F., Zhang, Y. Q., Liu, H. Y., Yu, L. Y., & Wei, D. P. (2016). Diversity and distribution of fungal communities in the marine sediments of Kongsfjorden, Svalbard (High Arctic). *Scientific Reports, 6*(1), 33162. https://doi.org/10.1038/srep33162

Zhang, X., Zhang, L., & Wang, J. (2023). Statistical optimization of waste molasses-based medium for exopolysaccharide production by *Bacillus piscis* BP5M. *Microbial Cell Factories*, 22, 48. https://doi.org/10.1186/s12934-023-02216-w

Zhou, Y., Zhang, H., Li, X., & Wang, J. (2020). *Inhibitory effects of Serratia marcescens prodigiosin on Microcystis aeruginosa: mechanisms and applications*. Journal of Applied Microbiology, 128(3), 831–843. https://doi.org/10.1111/jam.14542

VIII. Anexos

Anexo 1

Información de puntos de muestreo

Tipo	Muestra	Mina	Código	UTM georeferences	Altitud (msnm)	Observaciones
SUELO	Suelo prístino - San Pedro	MLZ	PSP	0731335 9244709	3223	pH: 4.5 C.O: 8.8%, T.N.: 5430 mg/Kg Textura: franco arcilloso.
	Technosoil – La Zanja	MLZ	TCZ	0733269 9244976	3560	pH: 7.7 C.O: 6.8– 7.9%, T.N.: 2459-3076 mg/Kg Textura: franco arenosa Composición: tierra vegetal, biomasa vegetal, residuos orgánicos, lodos de depuradora de aguas
	Technosoil revegetado- San Pedro	MLZ	TCP	0731909 9245363	3299	pH: 6.5 – 7.5; CO: 5– 8.8%, T.N.: 2400-3500 mg/Kg Textura: franco arenoso, sembrado con *Lolium sp., Trifolium sp., Festuca sp. Vicia sp., Lupinus sp.,* y *Cytisus sp.*
	Topsoil - DMO	MLZ	TSO	0732169 9244278	3546	pH 4-4.7 C.O: 4.4 -8% T.N.: > 3300mg/kg Textura: franco arcilloso.
	Topsoil - Coimolache	CMC	TSC	757482.22 9256252.37	3932	pH: 3.9 C.O: 3 – 5%, T.N.: > 2000mg/kg Textura: franco arcilloso.
	Topsoil - DM1	CMC	TSD	753665 9255506.84	3800	pH: 4.27 C.O: 5 – 7%, T.N.: > 2000mg/kg Textura: franco arcilloso.

TAJOS	Pared naranja seca - San Pedro	MLZ	POD	0731929 9245338	3299	pH: 1-2 Litología: Rocas piroclásticas, tobas de 8% de cristales con ojos de cuarzo, con alteración argílica avanzada (alunita – pirofilita – dickita – caolín) del sistema de alta sulfuración con presencia de óxidos (goethita y jarosita).
	Pared naranja húmeda - San Pedro	MLZ	POW	0731935 9245325	3294	pH: 1-2 Litología: Rocas piroclásticas, tobas de 8% de cristales con ojos de cuarzo, con alteración argílica avanzada (alunita – pirofilita – dickita – caolín) del sistema de alta sulfuración con presencia de óxidos (goethita y jarosita).
	Pared gris - San Pedro	MLZ	GP	0731911 9245364	3300	pH: 1-2 Litología: Rocas piroclásticas, tobas de 8% de cristales con ojos de cuarzo, con alteración argílica avanzada (alunita – pirofilita – dickita – caolín) del sistema de alta sulfuración – ambiente ácido (pH: 1 – 2), con presencia de sulfuros (sílice + pirita y enargita).
	Hold road	MLZ	HR	0731721 9244236	3399	pH: 4-5 Litología: Brechas de cuarzo turmalino, clastos polimícticos subredondeados (principalmente piroclásticos), matriz de cuarzo turmalino, con alteración fílica (sericita + caolín), evidencia de sistemas tipo pórfido, mineralización mixta (goethita, hematita, pirita).
Agua	Agua de escorrentía San Pedro	MLZ	WP	0731935 9245325	3294	pH: 3.5 Visualmente limpio y transparente.

C.O.: Carbono Orgánico, T.N.: Nitrogeno Total.

Anexo 2

Número inicial de esporas de hongos utilizadas para el ensayo

N	CÓDIGO DEL HONGO	NRO. INICIAL DE ESPORAS PARA INOCULAR (esporas/ml)
1	HUK 3.3	150000
2	HOK 7.4	2200000
3	HOK 6.5	150000
4	HOK 9.5	26700000
5	HUK 4.3	1850000
6	HPK 1.1	95600000
7	HPK 2.1	3600000
8	HEB 2.2	11300000
9	HEB 1.2	500000

Anexo 3

Tabla de Evaluación del Aspecto Superficial

Criterio	Descripción	Puntuación (1-5)
Rugosidad	Grado de irregularidad o aspereza de la superficie.	1 = Muy lisa, 5 = Muy rugosa
Brillo	Presencia de reflejos o apariencia opaca.	1 = Muy opaco, 5 = Muy brillante
Color	Intensidad y uniformidad del color observado.	1 = Descolorido, 5 = Intenso y homogéneo
Homogeneidad	Uniformidad en la cobertura o distribución del *biofilm* o residuo superficial.	1 = Muy heterogéneo, 5 = Muy uniforme
Cobertura (%)	Proporción aproximada de la superficie cubierta.	1 = <20 %, 5 = >90 %

Anexo 4

Protocolo de extracción

EXTRACCION DE DNA EN SUELO PowerSoil® DNA Isolation Kit

1. A) Agregar 0.5 g de suelo en los tubos PowerBead.
   B) Centrifugar 50 ml de agua y utilizar 0.25 g sedimento (evaluar si se necesita centrifugar más agua)
2. Vortexear suavemente la muestra hasta homogenizar.
3. NOTA: Verificar si la SOLUCION C1 está precipitado, en caso lo estuviera calentar a 60°C para que se disuelva antes de su uso.
4. Agregar 60 µl de la **SOLUCION C1** e invertir varias veces o vortexear brevemente.

5. Vortexear vigorosamente por 10 minutos.
6. Centrifugar a 10,000*xg* por 30 segundos.
7. Transferir el sobrenadante (entre 400-500ul) a los tubos de 2 ml Collection Tube
8. Agregar 250 µl de la **SOLUCION C2** y vortexear por 5 segundos.
9. Incubar a 4°C por 5 minutos.
10. Centrifugar los tubos a temperatura ambiente a 10,000*xg* por 1 minuto.
11. Transferir 600 µl del sobrenadante
12. ante a los tubos de 2 ml Collection Tube tratando de no llevar restos del pellet.
13. Agregar 200 µl de la **SOLUCION C3** y vortexear brevemente.
14. Incubar a 4°C por 5 minutos.
15. Centrifugar los tubos a temperatura ambiente a 10,000*xg* por 1 minuto.
16. Recuperar (600-750 µl) del sobrenadante a los tubos de 2 ml Collection Tube tratando de no llevar restos del pellet.
17. Agite ligeramente la solución C4 antes de usar.
18. Agregar (960-1200 µl) de la **SOLUCION C4** al sobrenadante y vortexear por 5 segundos
19. Filtrar la mezcla dentro de los SPIN FILTER.
    NOTA: Este proceso se debe realizar cargando un aproximado de 700 µl de la mezcla dentro de los SPIN FILTER, centrifugar a temperatura ambiente a 10,000*xg* por 1 minuto y eliminar el filtrado. Realizar el mismo proceso 2 veces más hasta filtrar toda la mezcla en el mismo SPIN FILTER (usar el mismo Collection Tube de 2ml en este proceso).
20. Agregar 500 µl de la **SOLUCION C5** al SPIN FILTER y centrifugar los tubos a temperatura ambiente a 10,000*xg* por 30 segundos.
21. Descartar lo filtrado.
22. Centrifugar nuevamente los tubos a temperatura ambiente a 10,000*xg* por 1 minuto (para terminar de descartar la solución).
23. Descartar lo filtrado.
24. Transferir el SPIN FILTER a un nuevo Collection Tube de 2ml.
25. Agregar 100 µl de la **SOLUCION C6.**
26. Centrifugar los tubos a temperatura ambiente a 10,000*xg* por 30 segundos.
27. Descartar el SPIN FILTER.
28. Almacenar el DNA a -20°C.

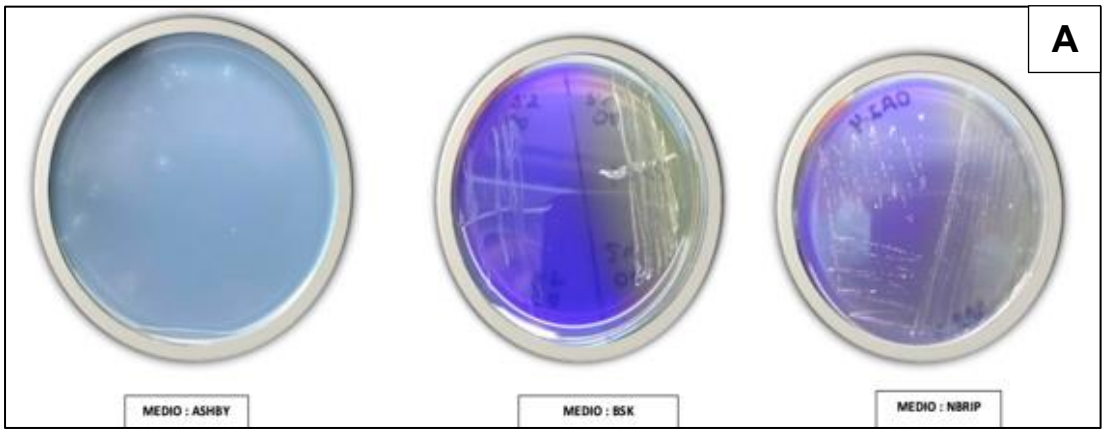
Anexo 5

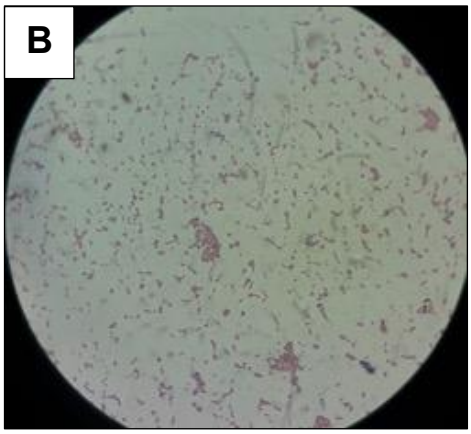
Imágenes de trabajo

5.1. Toma de muestra en suelos y tajos en MLZ y CMC – Cajamarca

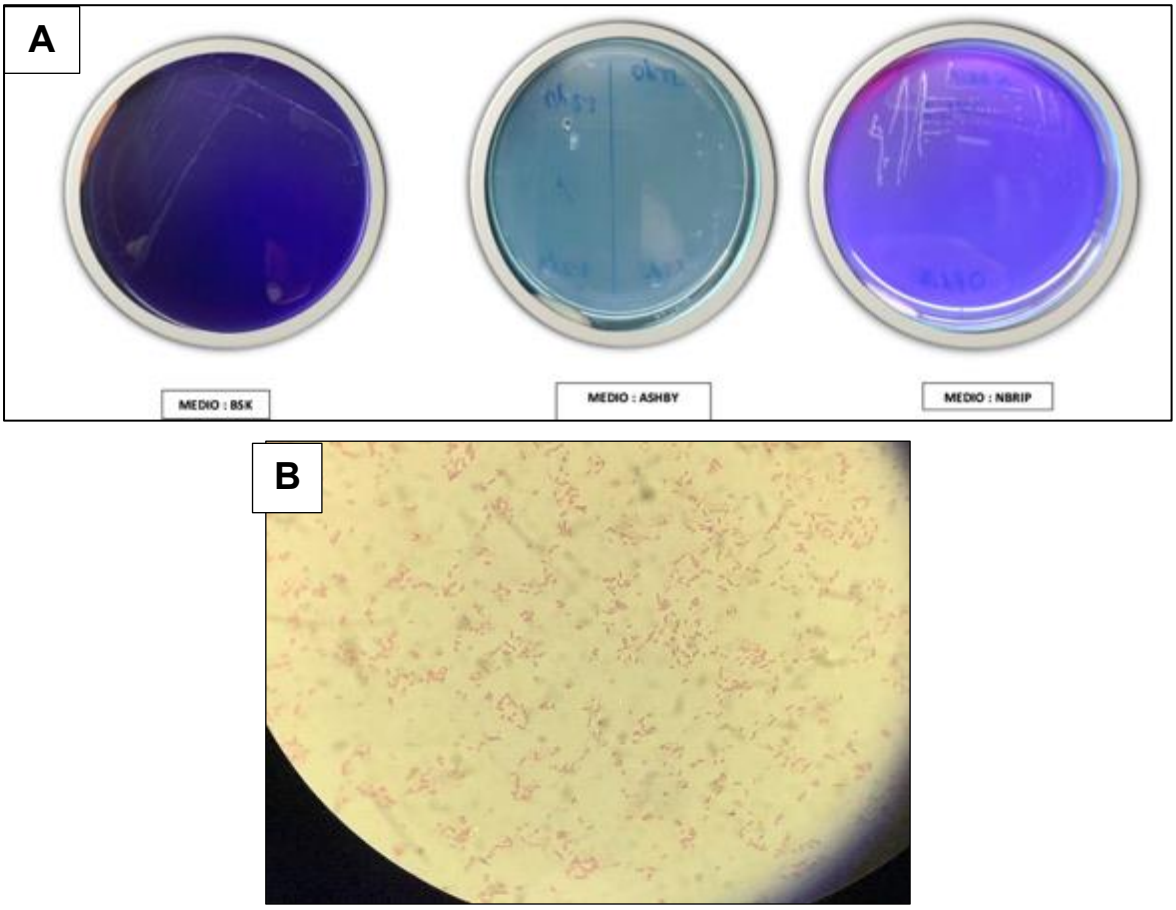


5.2. Acinetobacter septicus (OA2): A. Aislado en medios específicos. B. Observación con tinción Gram

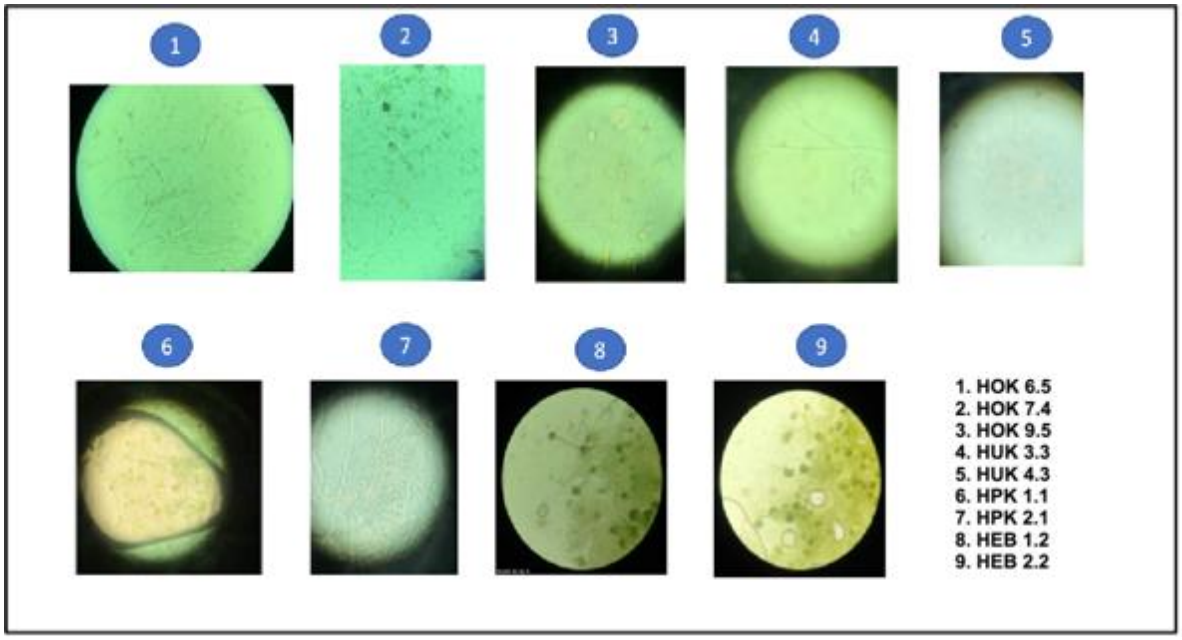




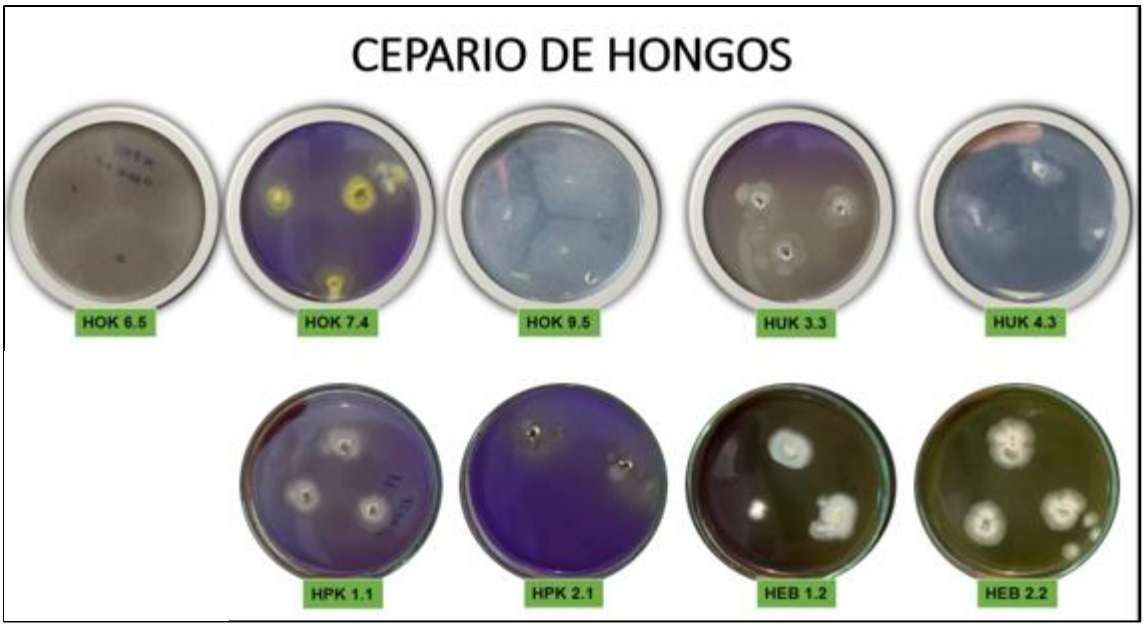
5.3. Serratia sp. (OP1): A. Aislado en medios específicos. B. Observación con tinción Gram



5.4. Microscopía de hongos



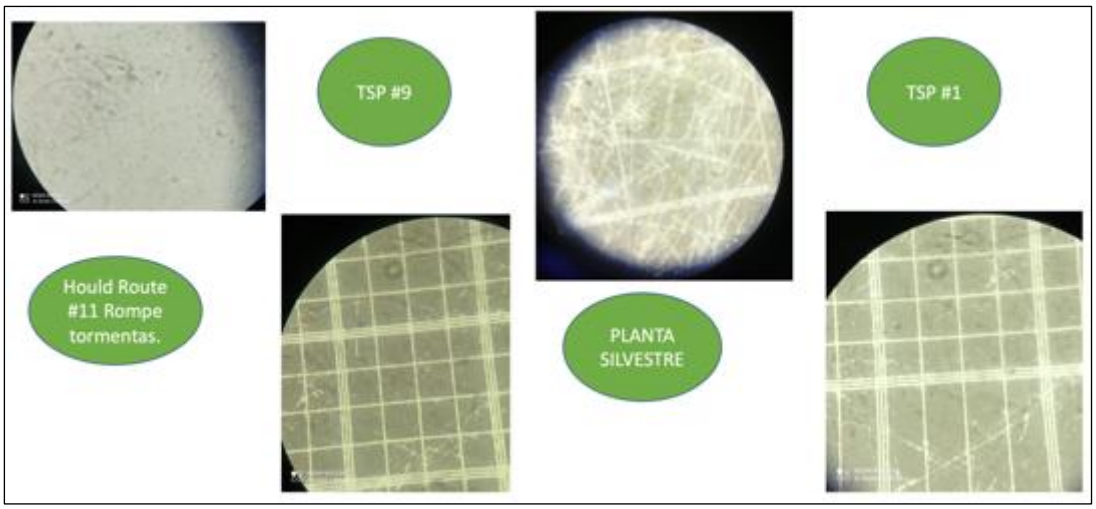
5.5. Cepario de hongos



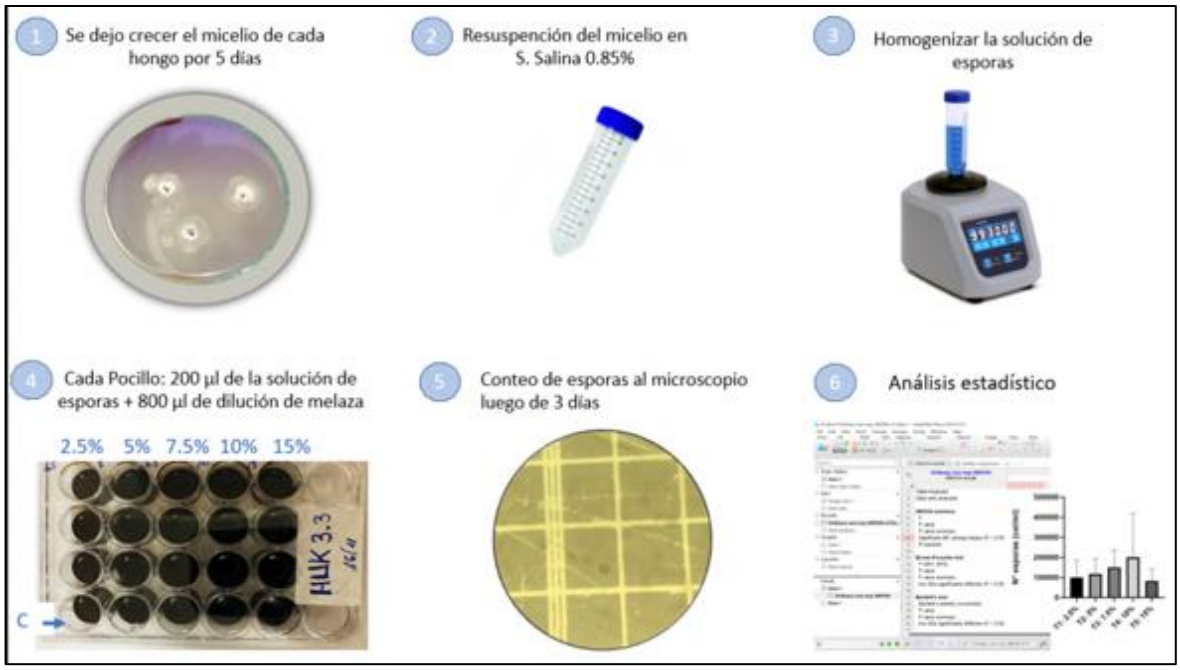
5.6. Cepario de cianobacterias/microalgas en placas y tubos



5.7. Observación microscópica de cianobacterias y/o microalgas



5.8. Masificación de hongos con melaza



5.9. Masificación de cianobacterias y/o microalgas de 100 a 500 ml





5.10. Antagonismo entre hongos

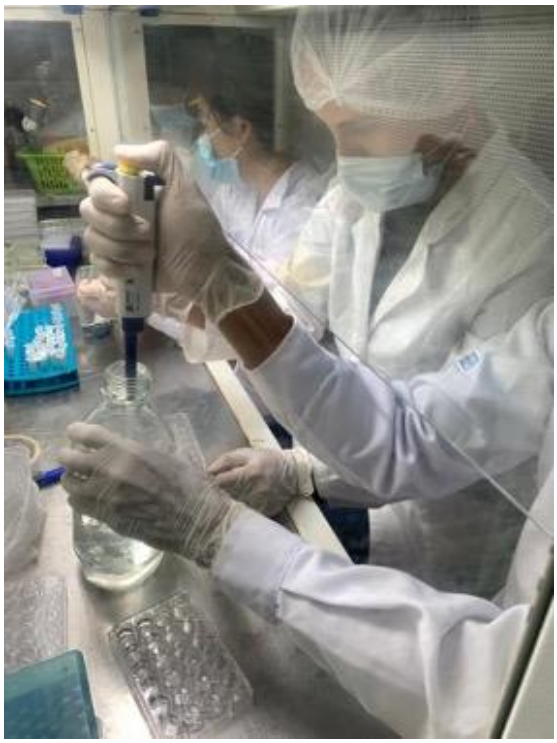




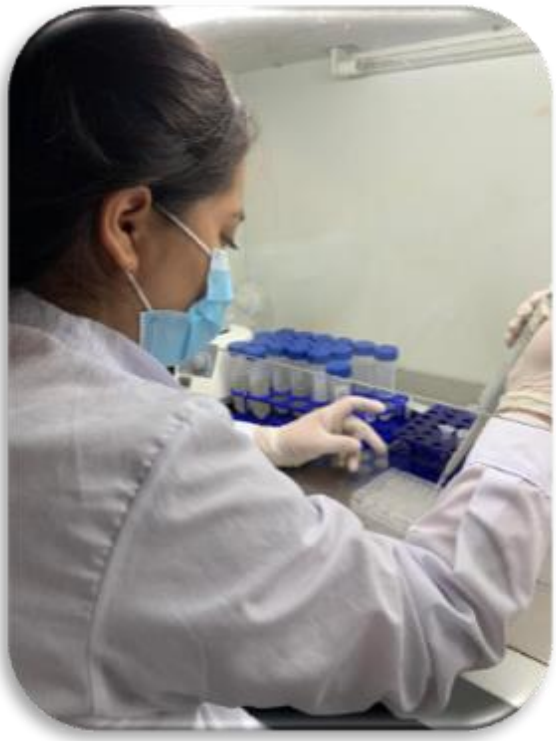


5.11. Antagonismo entre bacterias y cianobacterias/microalgas





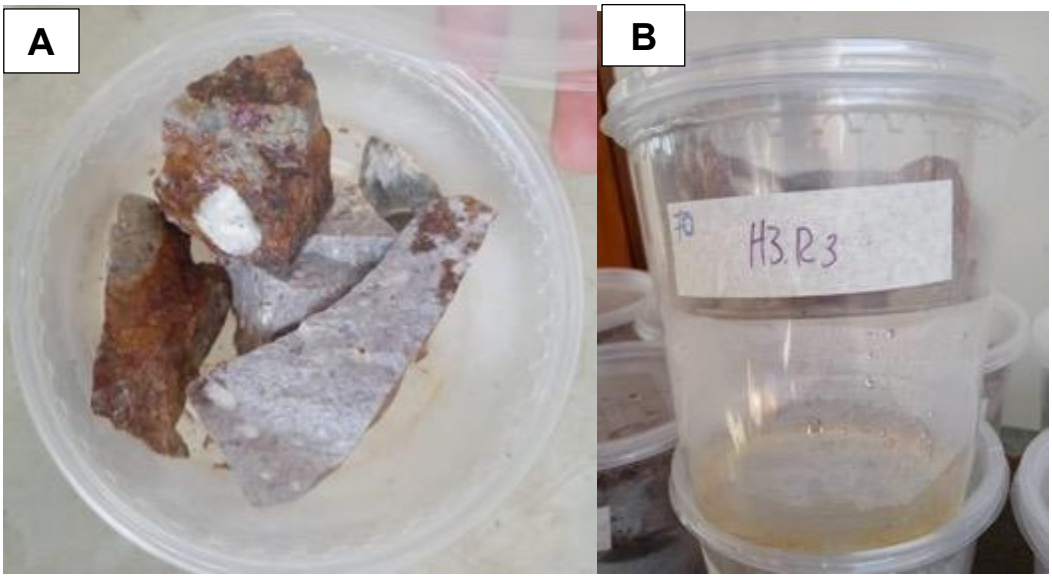
5.12. Bioensayo de bacterias formadoras de biofilm



5.13. Bioensayo de colonización de bacterias



5.14. Bioensayo de hongos: A. Colonización del hongo sobre la roca.B. Disposición de tarrina: tarrina de 1/kg con roca sobre tarrina de 1 kg



5.15. Bioensayo en diferentes sustratos



5.16. Bioensayo en rocas de gran tamaño

