



Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Sede Ibarra

ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES

INFORME FINAL DEL PROYECTO

TEMA:

**AISLAMIENTO DE CONSORCIO BACTERIANO DE LA FUENTE TERMAL DE PUCARÁ, PERTENECIENTE AL CANTÓN URCUQUÍ-IMBABURA PARA LA LIXIVIACIÓN DE COBRE DEL PROYECTO TIPO A “BIOSENSORES”**

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
INGENIERO EN CIENCIAS AMBIENTALES Y ECODESARROLLO

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN:

Línea 4. Gestión sostenible y aprovechamiento de recursos naturales

Sublínea. Ambiente y Biodiversidad

**AUTOR:** César Arturo Arcos Ortiz

**ASESOR:** Mgs. Santiago Xavier Mafla Andrade

IBARRA, JULIO – 2019



Ibarra, 22 de julio del 2019

Mgs. Santiago Xavier Mafla Andrade  
ASESOR

**CERTIFICA:**

Haber revisado el presente informe final de investigación, el mismo que se ajusta a las normas vigentes en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA), de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI); en consecuencia, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.

(f) .....

Mgs. Santiago Xavier Mafla Andrade

C.C.: 100265839-9



### **APROBACIÓN DEL TRIBUNAL**

*El jurado examinador, aprueba el presente informe de investigación en nombre de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI):*

(f):.....  


*Mgs. Santiago Xavier Mafla Andrade*

*C.C.: 100265839-9*

(f):.....  


*Mgs. Moraima Cristina Mera Aguas*

*C.C.: 100174372-1*

(f):.....  


*Ph.D. Rubén del Toro Déniz*

*C.C.:1757544447-1*



## ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo César Arturo Arcos Ortíz, declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 165 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, que manifiesta textualmente: “Se reconoce facultad de los autores y demás titulares de derechos de disponer de sus derechos o autorizar las utilizaciones de sus obras o prestaciones, a título gratuito u oneroso, según las condiciones que determinen. Esta facultad podrá ejercerse mediante licencias libres, abiertas y otros modelos alternativos de licenciamiento o la renuncia”.

Ibarra, 22 de julio de 2019

f): .....  


César Arturo Arcos Ortíz

C.C.: 040168156-4



## AUTORÍA

Yo, César Arturo Arcos Ortíz, portador de la cédula de ciudadanía N° 040168156-4, declaro que la presente investigación es de total responsabilidad del autor, y eximo expresamente a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra de posibles reclamos o acciones legales.

f): .....

César Arturo Arcos Ortíz

C.C.: 040168156-4



## DECLARACIÓN y AUTORIZACIÓN

Yo: César Arturo Arcos Ortiz, con CC: 040168156-4, autor del trabajo de grado intitulado: Aislamiento de consorcio bacteriano de la fuente termal de Pucará, perteneciente al cantón Urcuquí-Imbabura para la lixiviación de cobre del proyecto tipo A “Biosensores”, previo a la obtención del título profesional de Ingeniero en Ciencias Ambientales y Ecodesarrollo en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede- Ibarra, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCESI el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Ibarra, 22 de julio de 2019

(f.).....

César Arturo Arcos Ortiz

C.C. 040168156-4



## DECLARACIÓN DE COMPORTAMIENTO ÉTICO

Por medio de la presente declaro conocer y aplicar en la elaboración, desarrollo y evaluación del Proyecto de Titulación: **“Aislamiento de consorcio bacteriano de la fuente termal de pucará, perteneciente al cantón Urcuquí-Imbabura para la lixiviación de cobre del proyecto tipo a “Biosensores”**” lo propuesto en el Código de Ética de la Investigación y el Aprendizaje de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, aprobado por el Consejo Superior de la PUCE con fecha 15 de enero de 2018.

Ibarra, 22 de julio de 2019

(f.).....

César Arturo Arcos Ortiz

C.C.: 040168156-4

## **DEDICATORIA**

*A mi papi Gonzalo Arcos, a mi mamita Clarita Ortíz y a mi hermana Geovy. Por ser mi motivación, impulso y ejemplos ante lo que se debe y lo que no hacer ante diversas circunstancias de la vida, esto va por ustedes.*

## AGRADECIMIENTO

*Agradezco desde el fondo de mi corazón a Dios, por poner en mi camino a todas esas personas maravillosas que me dieron la mano y pusieron su granito de arena para la realización de esta investigación.*

*A mis padres, a los cuales les debo mi vida entera, mi respeto y admiración, por confiar en mí, porque a pesar de grandes caídas han estado ahí apoyándome y viendo cómo puedo sobresalir y enfrentar las cosas que me ha puesto la vida, por su infinito amor, por acompañarme en los muestreos, en toda mi vida universitaria y mi día a día, como hijo, estudiante y deportista, los amo.*

*A mi hermanita, por aferrarse a la idea de que me gradúe pronto y por acompañarme en los muestreos, ser mi fotógrafa personal y mi gran compañera de la vida, a ti también te amo mucho.*

*A esa persona especial, por ser mi mejor amiga, apoyo y compañera en toda la travesía que fue el realizar esta investigación, por corregir mis errores y hacer de mí alguien mejor.*

*A mi negrita Janny, por su amistad infinita que ha trascendido desde hace ya 10 años, te quiero muchísimo, esta investigación literalmente se realizó gracias a ti y a Don Rodrigo, tu padre, sin ustedes jamás hubiera conocido los puntos de muestreo.*

*A mi asesor Santiago, quien me compartió sus conocimientos y ese apego biotecnológico dirigido hacia un ambiente sano y sostenible, por enseñarme que hay diversas maneras de enfrentar los problemas, que el mundo es demasiado grande para encerrarnos en nuestro pueblito y que jamás se debe desperdiciar la oportunidad de conocer cosas nuevas, de todo corazón gracias inge. A mi doctora Mory, por confiar en mí desde primer semestre y que un “no puedo” será fácilmente demolido por un “César tu si puedes, demuéstrame que puedes”, gracias por enseñarme todo lo que sé, es la mejor profe de química del mundo, le quiero mucho.*

*A mis amigos Majito, Jacobo, Melany y Jhonny por su sincera amistad y gratos recuerdos que dejan en mí, pues la universidad permite formarnos académicamente, pero su humildad, confianza y lealtad no se consiguen fácilmente, gracias amigos. Así mismo a mi grupo de trabajo, con quienes supimos sobrellevar diferencias para ser siempre los mejores*

*Al señor Nelson Recalde por su recibimiento y accesibilidad a las vertientes de aguas termales y hacer viable el proyecto, muchas gracias.*

## CONTENIDO

1.	RESUMEN .....	1
2.	ABSTRACT .....	2
3.	INTRODUCCIÓN.....	3
4.	Objetivos: .....	6
4.1.	General:.....	6
4.2.	Específicos .....	6
5.	Hipótesis:.....	7
6.	Estado del arte .....	8
6.1.	Movilización de metales pesados .....	8
6.1.1.	Biolixiviación .....	8
6.2.	Inmovilización de metales pesados.....	8
6.2.1.	Biosorción.....	9
6.2.2.	Bioacumulación .....	9
6.2.3.	Biom mineralización.....	10
6.2.4.	Biotransformación .....	10
6.3.	Cobre.....	11
6.3.1.	Consumo de cobre a nivel mundial .....	11
6.3.2.	Toxicidad del cobre para el ser humano.....	12
6.3.3.	Propiedades bactericidas del cobre.....	12
6.3.4.	Proyectos mineros de cobre en el Ecuador .....	13
6.4.	Caracterización físico-química y biológica de fuentes geotermales.....	13
6.5.	Aplicación de bacterias termofílicas.....	15
6.6.	Mecanismos de la homeostasis del cobre en bacterias. ....	19
6.7.	Medio de Cultivo. ....	20
7.	Materiales y Métodos .....	22
7.1.	Materiales de campo .....	23
7.2.	Materiales y equipos de Laboratorio .....	23

7.2.1.	Materiales .....	23
7.2.2.	Equipos .....	24
7.2.3.	Reactivos .....	24
7.3.	Materiales de Oficina.....	25
7.4.	Insumo de análisis.....	25
7.5.	Metodología.....	25
7.5.1.	Toma de muestras.....	25
7.5.2.	Medición de la Temperatura.....	25
7.5.3.	Medición de pH .....	26
7.5.4.	Medición de conductividad .....	26
7.5.5.	Medición de color.....	26
7.5.6.	Medición de Turbidez.....	27
7.5.7.	Medición de cobre .....	27
7.5.8.	Medición de Sulfatos .....	28
7.5.9.	Medición de Hierro.....	28
7.5.10.	Medición de DQO (Demanda Química de oxígeno).....	29
7.5.11.	Medición de DBO (Demanda Biológica de Oxígeno).....	29
7.5.12.	Dureza cálcica y magnésica.....	30
7.5.13.	Comprobación de Recuperación de Cobre .....	31
7.5.14.	Aislamiento del consorcio bacteriano.....	31
7.5.15.	Extracción de ADN .....	33
7.5.16.	Tinción de Gram.....	33
7.5.17.	Preparación del lisado de bacterias Gram positivas. ....	33
7.5.18.	Lavado de ADN.....	34
7.5.19.	Elución de ADN .....	34
7.5.20.	Amplificación del gen ADNr 16s.....	34
7.5.21.	Electroforesis en gel de agarosa .....	36
7.5.22.	Cuantificación de bacterias.....	36
7.5.23.	Análisis estadístico .....	37
8.	Resultados y Discusión.....	38
8.1.	Caracterización física y química de las muestras. ....	38
8.2.	Caracterización biológica.....	42

8.3.	Secuenciación de las cepas estudiadas.....	43
8.3.1.	Cepa 1.....	44
8.3.2.	Cepa 2.....	44
8.3.3.	Cepa 3.....	44
8.3.4.	Cepa 4.....	44
8.3.5.	Cepa 5.....	45
8.3.6.	Cepa 6.....	45
8.3.7.	Cepa 7.....	45
8.4.	Análisis estadístico del crecimiento celular y recuperación de cobre de las cepas aisladas.....	46
8.4.1.	Análisis de Varianza del crecimiento celular por absorbancia en el proceso de biolixiviación de cobre.....	47
8.4.2.	Análisis de Varianza de la biolixiviación de cobre por las cepas aisladas.....	58
8.5.	Socialización.....	66
9.	Conclusiones.....	67
10.	Recomendaciones.....	68
11.	Referencias.....	69
12.	Anexos.....	80

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reactivos utilizados para la PCR .....	35
Tabla 2. Resultados de los análisis Físico-Químicos de la muestra 1, 2 y 3 .....	39
Tabla 17. Secuencias relativamente más cercanas secuenciadas por BLAST .....	43
Tabla 3. Test de normalidad y homogeneidad de varianza para el crecimiento celular de las bacterias lixiviantes.....	46
Tabla 4. Conversiones para el crecimiento celular por absorbancia promedio del periodo de 24 horas (n=3).....	46
Tabla 5. Conversiones para el crecimiento celular por absorbancia promedio del periodo de 48 horas (n=3).....	47
Tabla 6. Conversiones para el crecimiento celular por absorbancia promedio del periodo de 72 horas (n=3).....	47
Tabla 7. Análisis de Varianza del crecimiento celular por absorbancia a las cero horas de incubación de las bacterias lixiviantes.....	48
Tabla 8. Análisis de Varianza del crecimiento celular por absorbancia a las 12 horas de incubación de las bacterias lixiviantes.....	49
Tabla 9. Análisis de Varianza del crecimiento celular por absorbancia a las 24 horas de incubación de las bacterias lixiviantes.....	50
Tabla 10. Análisis de Varianza del crecimiento celular por absorbancia a las 48 horas de incubación de las bacterias lixiviantes.....	52
Tabla 11. Análisis de Varianza del crecimiento celular por absorbancia a las 72 horas de incubación de las bacterias lixiviantes.....	53
Tabla 12. Test de normalidad y homogeneidad para la recuperación de cobre de las bacterias lixiviantes. ....	57
Tabla 13. Análisis de Varianza de la recuperación de cobre a las 12 horas de incubación de las bacterias lixiviantes. ....	58
Tabla 14. Análisis de Varianza de la recuperación de cobre a las 24 horas de incubación de las bacterias lixiviantes. ....	59
Tabla 15. Análisis de Varianza de la recuperación de cobre a las 48 horas de incubación de las bacterias lixiviantes. ....	60
Tabla 16. Análisis de Varianza de la recuperación de cobre a las 72 horas de incubación de las bacterias lixiviantes. ....	62

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tres puntos de muestreo en las vertientes de aguas termales, en la Parroquia San Blas, cantón Urcuquí, provincia de Imbabura. ....	22
Figura 2. Espectrofotómetro NOVA 60. ....	29
Figura 3. Identificación de colonias por sus características morfológicas. ....	32
Figura 4. Termociclador para PCR. ....	35
Figura 5. Electroforesis en gel de Agarosa. ....	36
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 2%, para la caracterización de ácidos nucleicos de las cepas en estudio. ....	42
Figura 7. Prueba Tukey al 5% para el crecimiento celular a las cero horas de tratamiento .....	48
Figura 8. Prueba Tukey al 5% para el crecimiento celular a las 12 horas de tratamiento .....	50
Figura 9. Prueba Tukey al 5% para el crecimiento celular a las 24 horas de tratamiento .....	51
Figura 10. Prueba Tukey al 5% para el crecimiento celular a las 48 horas de tratamiento. ....	52
Figura 11. Prueba Tukey al 5% para el crecimiento celular a las 72 horas de tratamiento. ....	54
Figura 12. Comparación del crecimiento celular en los diferentes periodos de análisis, en un medio enriquecido con cobre a una concentración de $100 \text{ mg.l}^{-1}$ .....	55
Figura 13. Bacterias formando un film con el cobre recuperado, visto a través de un microscopio con aumento de 40X .....	57
Figura 14. Prueba Tukey al 5% para la recuperación de cobre a las 12 horas de tratamiento. ....	59
Figura 15. Prueba Tukey al 5% para la recuperación de cobre a las 24 horas de tratamiento. ....	60
Figura 16. Prueba Tukey al 5% para la recuperación de cobre a las 48 horas de tratamiento. ....	61
Figura 17. Prueba Tukey al 5% para la recuperación de cobre a las 72 horas de tratamiento. ....	62
Figura 18. Comparación de la recuperación de cobre en los diferentes periodos de análisis, en un medio enriquecido con cobre a una concentración de $100 \text{ mg.l}^{-1}$ .....	63

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Identificación taxonómica de la cepa 1.....	80
Anexo 2. Identificación taxonómica de la cepa 2.....	80
Anexo 3. Identificación taxonómica de la cepa 3.....	81
Anexo 4. Identificación taxonómica de la cepa 4.....	81
Anexo 5. Identificación taxonómica de la cepa 5.....	82
Anexo 6. Identificación taxonómica de la cepa 6.....	82
Anexo 7. Identificación taxonómica de la cepa 7.....	83
Anexo 8. Tabla 2 del Acuerdo Ministerial 097 Criterios de remediación (valores máximos permisibles) .....	83
Anexo 9. ADN secuenciado de la cepa 1 .....	84
Anexo 10. ADN secuenciado de la cepa 2 .....	85
Anexo 11. ADN secuenciado de la cepa 3 .....	86
Anexo 12. ADN secuenciado de la cepa 4 .....	86
Anexo 13. ADN secuenciado de la cepa 5 .....	87
Anexo 14. ADN secuenciado de la cepa 6 .....	88
Anexo 15. ADN secuenciado de la cepa 7 .....	90
Anexo 16. Bacterias en proceso de lixiviación de cobre.....	92
Anexo 17. Trabajo de laboratorio, caracterización exsitu.....	92
Anexo 18. Muestreo y caracterización insitu .....	92
Anexo 19. Transformaciones estadísticas para el crecimiento celular a las 24 horas ....	93
Anexo 20. Transformaciones estadísticas para el crecimiento celular a las 48 horas ....	93
Anexo 21. Transformaciones estadísticas para el crecimiento celular a las 72 horas ....	93
Anexo 22. Carta de aceptación para la ponencia en el IV Congreso Internacional de Medio Ambiente y Desarrollo.....	94
Anexo 23. Agenda para el 4 de abril de 2019 del Evento .....	95
Anexo 24. Socialización de la metodología realizada en la investigación.....	96
Anexo 25. Socialización de los resultados obtenidos en la investigación.....	96
Anexo 26. Certificado de la ponencia .....	96
Anexo 27. Representantes de la PUCESI en el IV Congreso Internacional de Medio Ambiente y Desarrollo.....	97
Anexo 28. Listado de participantes presentes en la socialización.....	98
Anexo 29. Encuesta de la socialización de la investigación.....	100

Anexo 30. Análisis de la tabulación de los resultados de la socialización de la investigación..... 101

## 1. RESUMEN

La investigación tuvo como objetivo el aislar una cepa nativa de las aguas termales del Pucará, Urcuquí, Imbabura, capaz de lixiviar el cobre sin la necesidad de utilizar métodos convencionales, para lo cual se establecieron tres puntos de muestreo en las fuentes de agua termal de la zona de estudio: reservorio principal (P1), reservorio secundario (P2) y vertiente anexa al río (P3), de los cuales se realizó el respectivo análisis físico-químico, teniendo como principales resultados un pH de 5,9, una temperatura de 40°C y una concentración de cobre de 3,2 mg.l<sup>-1</sup>, mismos que sirvieron como base experimental para su replicación en laboratorio.

En la fase experimental se aislaron los consorcios bacterianos, utilizando cajas Petri con agar LB, replicando las condiciones del medio, para caracterizar las cepas existentes por su tamaño, forma y color, en donde se encontraron 36 cepas diferentes las cuales se pasaron a tubos de ensayo con caldo LB Invitrogen bajo condiciones extremas de 100 mg.l<sup>-1</sup> de cobre, un pH de 3,3 y la misma temperatura, en donde se pudo hallar 7 cepas resistentes a cobre, identificadas mediante la extracción de ADN y la reacción en cadena de polimerasa, enviando a Macrogen para su respectiva secuenciación e identificación.

Se midió las concentraciones de cobre a las 24, 48 y 72 horas mediante la digestión ácida de aguas para el total de metales recuperables o disueltos para su análisis mediante espectroscopía, siendo el tiempo de retención óptimo 48 horas en donde dos cepas lixiviaron un máximo de 81% (*Thermothelomyces thermophilus*) y 78% (*Spirochaeta thermophila*).

Palabras Clave: cobre, lixiviación, minería, cepas, bacterianas.

## 2. ABSTRACT

The objective of the research was to isolate a native strain from the thermal waters of Pucará, Urcuquí, Imbabura, capable of leaching copper without the need to use conventional methods, for which three sampling points were established in the thermal water sources of the study area: main reservoir (P1), secondary reservoir (P2) and slope attached to the river (P3), of which the respective physico-chemical analysis was carried out, having as main results a pH of 5.9, a temperature of 40 ° C and a copper concentration of 3.2 mg.l<sup>-1</sup>, which served as experimental base for its replication in the laboratory.

In the experimental phase, the bacterial consortiums were isolated, using Petri dishes with LB agar, replicating the conditions of the medium, to characterize the existing strains by their size, shape and color, where 36 different strains were found which were transferred to tubes of LB Invitrogen broth assay under extreme conditions of 100 mg.l<sup>-1</sup> copper, a pH of 3.3 and the same temperature, where 7 copper-resistant strains could be found, identified by DNA extraction and the polymerase chain reaction, sending to Macrogen for its respective sequencing and identification.

Copper concentrations were measured at 24, 48 and 72 hours by acid digestion of water for the total of recoverable or dissolved metals for analysis by spectroscopy, with an optimum retention time of 48 hours in which two strains leached a maximum of 81% (*Thermothelomyces thermophilus*) and 78% (*Spirochaeta thermophila*).

Keywords: copper, leaching, mining, strains, bacterial.

### 3. INTRODUCCIÓN

La actividad minera a gran escala dentro del país se realiza desde 1897, en donde se experimentaron ciertos cambios con la innovación tecnológica, sin embargo, los impactos ambientales que estas generan, de poco a poco se han convertido en puntos críticos de contaminación, de los cuales probablemente no se tenga reparación, ya que constantemente producen varios impactos tanto ambientales, económicos y sociales, pues dicha actividad no solo afecta a sus alrededores, sino que también su matriz productiva se ve minimizada al no tener una efectividad de extracción del mineral requerido (Pérez, *et al.*, 2016).

Actualmente la minería en el Ecuador es foco principal de problemas sociales, legales, económicos y sobre todo ambientales, debido a la mala práctica artesanal o ilegal de la misma. Por otra parte, la Minería legalizada es una gran fuente de empleo y dinero para el Ecuador, ya que se tiene estimado que proyectos como Mirador (Zamora), Cascabel (Imbabura), Llorimagua (Imbabura), Loma Larga y Río Blanco (Azuay), entre otros, aportarían al Ecuador con 10 000 millones de dólares hasta el 2021, lo que se estima en un 4% del PIB ecuatoriano (Illesca, 2017). No obstante, la extracción minera con la aplicación de métodos tradicionales, tiene una eficiencia que varía entre el 75% y 85% (Algucil, 1998) y el remanente minero o relave tiene concentraciones significantes de metales pesados, lo que puede ocasionar problemas ambientales como: deterioro de la biodiversidad del suelo, agua y ecosistemas completos.

Los problemas de impacto ambiental y los costos que implican la operatividad de una mina, pueden ser reducidos a la par, mediante la aplicación de tecnologías limpias como la biolixiviación, la cual consiste en una alternativa eficaz para el tratamiento y recuperación de minerales sulfurados, principalmente el cobre (Gonzaga, 2011). La creciente demanda mundial por metales como el cobre, exigen a la industria optimizar procesos o de otra parte extraer cobre de los relaves mediante biolixiviación para tener una mejor productividad, con la menor pérdida posible y contribuyendo al cuidado de los ecosistemas.

Con respecto a las afectaciones ambientales, la explotación minera según CODELCO, (2017), se emana gran cantidad de ácido sulfúrico y de arsénico al medio, los cuales se utilizan para precipitar el cobre de la muestra de suelo y poder procesarlo, generando una gran cantidad de lodos e impactos directos, al agua, suelo atmósfera y la biodiversidad existente en zonas aledañas, siendo de estos el recurso hídrico uno de los más

perjudicados debido a su propiedad de diluir los lodos y transportar los agentes nocivos hacia la cuenca o zonas más bajas del lugar de explotación, deteriorando la calidad agua para la agricultura y ganadería. Otro recurso que de igual manera presenta gran afectación es la atmósfera y calidad del aire debido a que la extracción de cobre a gran escala hace que dichos agentes ácidos en los hornos para su procesamiento, contaminen de sobremanera con la emanación de gases de azufre y amonio, sin dejar de lado el deterioro de la diversidad natural que se da constantemente.

Una de las actividades que generan gran contaminación con metales pesados, es la minería a escala industrial, y no solamente la contaminación va dirigida a los acuíferos o aguas superficiales, que pueden abastecer a poblados para su consumo, sino también comprometer otros recursos como el suelo y el aire que pueden verse afectados por la materia prima utilizada para su extracción y los residuos que la misma deja (Español, 2012).

El usar métodos biológicos, para remediar un ambiente contaminado o recuperar un material de interés con ayuda de microorganismos, se denomina proceso de bioremediación el cual da una remoción específica del material o metal de interés, así como también puede ser flexible en el momento de proyección estratégica, para trabajar en otros campos, sean estos tanto ex situ como in situ (Cervantes, *et al.*, 2006).

La biorremediación como tal, de modo natural se puede realizar de manera efectiva en zonas húmedas, orillas de río o zonas vadosas de los acuíferos, debido a que, estas presentan condiciones aptas para estimular los procesos biológicos, ante una contaminación en el lugar. Estas técnicas han venido desarrollándose últimamente de manera efectiva para tratar contaminantes como hidrocarburos principalmente, sin embargo, las pruebas ex situ, o a escala laboratorio han demostrado el gran poder de las bacterias, al provocar un cambio en las propiedades químicas de algunos elementos contaminantes, haciendo posible su extracción o su inmovilización dentro del medio afectado (López, *et al.*, 2001).

El optar por un proceso de biolixiviación en la industria minera es de gran importancia tanto para las empresas que realizan dicha actividad como para las personas que se ven afectadas por la misma, sin dejar de lado las afectaciones ambientales que se puedan presentar a lo largo de la explotación y procesamiento del material minero de interés, a pesar que su beneficio varía entre un 75% y 85%, mediante la lixiviación acida de cobre

con ácido sulfúrico (Alguacil, 1998), no se tiene un rédito total de lo que se podría extraer a un porcentaje mayor llegando a un aproximado del 70 % más del remanente de la lixiviación acida. (Lovera, *et al.*, 2010). Por dicho motivo, el realizar una biolixiviación experimental en los laboratorios de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra, puede contribuir en el avance bio experimental sobre el aprovechamiento total o en su mayoría de material minero, ya que esta actividad se realiza en la provincia de Imbabura de manera masiva con afectaciones directas al medio ambiente.

Es importante mencionar que la biolixiviación como tal es una técnica que ayuda a disolver los metales de una muestra en un medio acuoso a través de la actividad bacteriana, habitualmente de *Thiobacillus ferroxidans*, *Acidithiobacillus ferroxidans* y demás bacterias del mismo género, las cuales permite liberar el cobre en un porcentaje más alto que con otras técnicas convencionales, estas bacterias son estudiadas actualmente debido a sus características de resistencia a altas temperaturas y acidez extrema, denominándose así como acidófilas y termófilas respectivamente (Newman, 2010).

En el caso de esta investigación se realizó una extracción de muestras de agua de la fuente geotérmica en el cerro de Pucará en el cantón Urcuquí de la provincia de Imbabura. Debido a que estas aguas poseen una concentración de sales indispensable para la existencia de este tipo de consorcios bacterianos. Las aguas termales al ser calentadas y provenir desde el manto terrestre tienen una composición similar, variando su concentración al momento de exponerse al ambiente por la existencia de factores externos, teniendo como elementos principales al Azufre y Arsénico (Lorca, 2005). Elementos contaminantes residuales durante el procesamiento de cobre.

#### **4. Objetivos:**

##### **4.1. General:**

Aislar un consorcio bacteriano de la fuente termal de Pucará, perteneciente al cantón Urcuquí-Imbabura para la lixiviación de cobre.

##### **4.2. Específicos**

1. Caracterizar físico-químico y microbiológicamente las muestras de agua tomadas de fuente geotérmica de Pucará, mediante análisis de laboratorio.
2. Aislar consorcio bacteriano resistente a cobre, mediante estrés químico para la segregación de bacterias termorresistentes.
3. Aplicar el consorcio microbiano capaz de lixiviar cobre mediante un ensayo de laboratorio.
4. Socializar los resultados de la investigación mediante una charla informativa.

## **5. Hipótesis:**

Ho (Hipótesis nula): El consorcio bacteriano aislado de las fuentes geotermales de Pucará, puede lixiviar cobre en condiciones de laboratorio.

Ha (Hipótesis alternativa): El consorcio bacteriano aislado de las fuentes geotermales de Pucará, no puede lixiviar cobre en condiciones de laboratorio.

Variables dependientes: concentración de cobre recuperado, crecimiento del consorcio bacteriano

Variables independientes: Temperatura, agitación y tiempo de estrés bacteriano.

## **6. Estado del arte**

### **6.1. Movilización de metales pesados**

La movilización de metales pesados se define como la capacidad que tienen algunas bacterias para poder liberar los metales de interés de algunos compuestos químicos o conglomerados geomórficos (Suárez y Reyes, 2002); el proceso más relevante de movilización de metales es la biolixiviación, usada en la extracción industrial de Cobre, Hierro, Níquel y Molibdeno.

#### **6.1.1. Biolixiviación**

La lixiviación bacteriana es un fenómeno conocido desde hace algún tiempo, sin embargo, es aplicada como una tecnología nueva o práctica minera limpia. Esta radica básicamente en extraer metales, que están inmersos en diferentes tipos de minerales, gracias a la acción de microorganismos específicos. La biolixiviación es un proceso que puede ser tomado como una opción alterna a los procesos químicos habituales, ya sea, en procesos netamente extractivos, como en procesos de remediación ambiental, aplicándolo en desechos provenientes de la actividad minera con un alto contenido de metales o minerales de baja ley como el cobre (Rohwerder, *et al.*, 2003 y Hendrich, *et al.*, 2006). El proceso de disolución puede verse acelerado por acción de microorganismos capaces de oxidar el metal, al igual que un catalizador químico.

El principal microorganismo estudiado es *Thiobacillus ferrooxidans*, que puede catalizar la oxidación de sulfuros inorgánicos que son difíciles de disolver a sulfatos inorgánicos solubles, de la misma manera que otros compuestos reducidos del azufre y hierro respectivamente. La energía que necesita la bacteria para poder satisfacer sus necesidades metabólicas la obtiene de las reacciones de oxidación de los compuestos existentes en el relave minero (Porro, *et al.*, 1988).

La mayoría de microorganismos que están implicados en el proceso de biolixiviación se diferencian por desarrollarse quimiolitotórficamente en ambientes que presentan un pH menor a 3, tener la capacidad de utilizar los compuestos reducidos del ion ferroso o azufre como fuente principal de energía y sobre todo por tener una concentración de iones metálicos alta (Rawlings, 1998 y Watling, 2006).

### **6.2. Inmovilización de metales pesados**

La inmovilización de metales se da gracias a la capacidad de algunos microorganismos de atrapar metales, uniéndolos en sus componentes estructurales (Suárez y Reyes, 2002),

en especial los microorganismos que son resistentes y tolerantes a metales pesados, los microorganismos resistentes, son conocidos como detoxificantes, los cuales son codificados genéticamente, mientras los que son tolerantes, se muestran indiferentes ante la presencia o ausencia de metales pesados. Estas características se presentan gracias a la acción de diversos mecanismos tales como: biosorción, bioacumulación, biomineralización y biotransformación (Vullo, 2003).

### **6.2.1. Biosorción**

La biosorción se conoce básicamente como la captación pasiva de los iones metálicos en la superficie de células de materiales biológicos inactivos, en donde se da lugar a la participación de fenómenos tales como quimisorción, fisorción, quelación, complejación, intercambio iónico y microprecipitación (Volesky, 2007).

Entre las ventajas que destacan a la biosorción están las siguientes:

- Evita que en los organismos vivos haya efectos tóxicos derivados del metal.
- Elimina la necesidad de nutrimentos para el desarrollo de los microorganismos.
- Acelera la remoción del metal
- El biosorbente es un subproducto derivado de procesos industriales por lo tanto es de bajo presupuesto
- Se tiene la posibilidad de recobrar tanto el biosorbente como el metal, por lo tanto, se genera una reducción en costos de operación.

Actualmente el proceso de biosorción de metales pesados por materiales biológicos inactivos es considerado como una alternativa viable para remover metales pesados de aguas residuales provenientes de industrias y de aguas de origen freático y superficial, por la gran eficiencia que tiene y a su bajo costo, principalmente cuando los metales están en bajas concentraciones (Rodríguez y Thelma, 2009 y Volesky, 2007)

Los grupos funcionales que están presentes en la estructura de la mayoría de los biosorbentes generalmente son de carácter aniónico (grupos carboxilo, hidroxilo, sulfuro, fosfato y otros), por lo que son apropiados para la sorción de cationes metálicos (Vullo, 2003).

### **6.2.2. Bioacumulación**

Es un sistema que incluye un mecanismo de transporte de membrana el cual mediante un gasto de energía internaliza al metal pesado que se encuentra en el entorno celular. Dicho

consumo energético se origina por medio del sistema ATPasa. Una vez que en el citoplasma se haya integrado el metal pesado, éste es retenido gracias a la existencia de proteínas llamadas metalotioneínas las cuales son ricas en grupos sulfhídricos o a su vez puede ser compartimentalizado en el interior de una vacuola, como sucede en el caso de los hongos. Existen muchos ejemplos bastante interesantes de este proceso en el que se destaca el caso de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* en la cual se detectó una acumulación de uranio el cual fue descubierto dentro del citoplasma, al igual que sucedió en el caso de la levadura conocida como *Saccharomyces cerevisiae* (Wang, *et al.*, 1997).

### **6.2.3. Biomineralización**

Este es un proceso mediante el cual ciertos microorganismos vivos favorecen una precipitación de minerales amorfos y cristalinos. Las estructuras que dan como resultado están conformadas por biominerales cristalinos en un 80% mientras que el 20% restante se compone de biominerales amorfos. Así mismo se considera al calcio como un elemento químico el cual constituye alrededor de un 50% de todos los biominerales, además de formar ciertas quelaciones con elementos metálicos como es el caso del arseniato de calcio que es precipitable y uno de los componentes tóxicos de la minería (Vullo, 2003). Es importante señalar que la biomineralización se lleva a cabo por medio de reacciones químicas que se dan entre compuestos o iones específicos, como consecuencia de las actividades metabólicas de las bacterias bajo algunas condiciones ambientales. Un claro ejemplo del proceso de biomineralización es la llamada “carbonatogenesis” en la cual se origina la precipitación del carbonato de calcio. En este caso se considera que el rol principal de las bacterias está relacionado a su capacidad de establecer ambientes con pH alto (alcalinos y con aumento en la concentración de carbono inorgánico diluido) gracias a su diverso dinamismo fisiológico (Lee, 2003).

Otra manera para precipitar metales pesados es por medio de la conformación de fosfatos o sulfuros, dados como productos de las actividades celulares enzimáticas. Como ejemplo de lo anteriormente dicho, se puede mencionar a la precipitación de sulfuros metálicos que se da en reactores que poseen cultivos mixtos de bacterias que son reductoras de sulfato o el caso de las bacterias *Klebsiella planticola* y *Pseudomonas aeruginosa* en donde se acumula Sulfuro de Cadmio (CdS) en su pared celular (Suárez y Reyes, 2002).

### **6.2.4. Biotransformación**

Es un mecanismo que implica que en el metal pesado haya una serie de cambios químicos que se pueden dar en su estado de metilación o de oxidación. El resultado que produce

esta transformación biológica en los metales que son tóxicos es la formación de compuestos que sean volátiles o poco solubles en agua. Un claro ejemplo de esto es el ciclo del mercurio en la naturaleza, en donde por acción de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* se da lugar a transformaciones de reducción del catión  $\text{Hg}^{2+}$  a Hg, seguido de esto otros microorganismos pueden metilarlo dando como resultado compuestos como  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  y  $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$  los cuales son volátiles y mucho más tóxicos que el mercurio (Vullo, 2003).

De la misma manera los procesos de reducción de cromo (VI) a cromo (III), Vanadio (V) a Vanadio (III) y de oro (III) a oro (0), conllevan a que el metal pesado se precipite bajo ciertas condiciones fisiológicas. De los metales descritos anteriormente el cromo es uno de los más utilizados en industrias de curtiembres, aceros, metalurgia, automóviles, entre otras. Por este motivo la Agencia de protección ambiental (EPA) considera a este metal como un contaminante de primera prioridad debido a que presenta gran movilidad en diferentes ambientes debido a que es estable en solución acuosa y posee un gran potencial cancerígeno y mutagénico. La inmovilización por disminución en la mutagenicidad y por precipitación de hidróxidos se produce por el pasaje a Cr (III). Por tal motivo para el tratamiento biológico de efluentes de origen industrial es de suma importancia emplear el uso de microorganismos que sean resistentes a Cr y que posean la capacidad de reducir el Cr (VI) en Cr (III) (Vullo, 2003).

### **6.3. Cobre**

El cobre es un elemento químico de número atómico 29, es considerado como un metal de transición, es de color rojizo y posee un brillo metálico, este elemento químico conjuntamente con el oro y la plata es uno de los mejores conductores eléctricos, posee una densidad de  $8,96 \text{ g}\cdot\text{ml}^{-1}$  lo cual le da características de metal pesado (ROTH, 2015). Este elemento ha formado parte de la vida de los seres humanos desde tiempos antiguos, debido a sus excelentes propiedades para: prevenir infecciones, el desarrollo de la humanidad, la mejora de la atención médica y calidad de vida, pero sobre todo por su característica antimicrobiana (Prado, *et al.*, 2012).

#### **6.3.1. Consumo de cobre a nivel mundial**

En el 2010, el mundo consumió 22 millones de toneladas de cobre, 16 millones provenientes de minas, el resto, aproximadamente el 35%, del reciclaje. Esto equivale a aproximadamente 2,4 kilogramos por persona. En el 2000, los ciudadanos de los países más ricos, con 15% de la población mundial, consumieron el 61,5% del cobre;

equivalente a 10 kilogramos por persona, mientras que, en Latinoamérica se consume 2 kilogramos por persona en el mismo período. En total, América del Sur consumió 534.000 toneladas de cobre en el 2000, comparado a 3'649.000 toneladas consumidos por Norte América (WBMS, 2008).

### **6.3.2. Toxicidad del cobre para el ser humano**

El cobre es considerado como un nutriente esencial para las funciones que cumple nuestro organismo, pero también puede volverse un contaminante del agua de consumo, ya que se utiliza para fabricar tuberías, válvulas y accesorios de fontanería, así como en aleaciones y revestimientos. Las concentraciones de cobre en el agua de consumo varían mucho de  $\leq 0,005$  hasta  $>30 \text{ mg.l}^{-1}$  y la fuente más frecuente es la corrosión de tuberías con este material, por lo que, el valor de referencia permisible establecido a partir de 1993 es de  $2 \text{ mg.l}^{-1}$  (Organización Mundial de la Salud, 2003).

El Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas (IPCS) (1998), concluyó que el límite máximo aceptable de ingesta por vía oral para adultos es dudoso, pero es probable que sea de 10 miligramos al día. Esta evaluación se basó únicamente en estudios sobre los efectos gastrointestinales del agua de consumo contaminada con cobre en un período corto, pero todavía hay ciertas dudas respecto a los efectos del cobre a largo plazo en poblaciones.

Estudios de años siguientes determinaron que la dosis máxima segura es  $12 \text{ mg.día}^{-1}$  para hombres, mientras que, en mujeres la dosis total es levemente menor debido a que su peso corporal es menor. La mayor parte de esta dosis es ingerida en los alimentos, mientras que el agua potable puede contribuir desde  $0,05 \text{ mg.día}^{-1}$  en el caso de agua potable. El contenido de cobre de los alimentos varía fuertemente, siendo mayor en carnes de vacuno que en vegetales y frutas (Araya, *et al.*, 2004).

### **6.3.3. Propiedades bactericidas del cobre.**

Prado, *et al.* (2012) mencionan que desde la antigüedad se conoce empíricamente las propiedades higiénicas del cobre, las cuales tras investigaciones son conocidas como propiedades antimicrobianas en la actualidad, por lo que se lo usa en la práctica médica por su efecto auto desinfectante y en las cañerías que transporta el agua para consumo con el fin de preservar su calidad sanitaria. Distintos investigadores usando los criterios exigidos por la Environmental Protection Agency (EPA) han demostrado que las

superficies de cobre o sus aleaciones tienen la capacidad de eliminar el 99,9% de bacterias patógenas en horas.

Existen otros estudios que indican que el cobre posee un efecto bacteriostático o bactericida, dependiendo de la concentración en el medio. Además de su capacidad para destruir virus como la influenza A y virus de inmunodeficiencia humana en concentraciones tan bajas como 0,16 a 1,6 mM. No está totalmente claro el mecanismo que explica la actividad antimicrobiana del cobre, pero, un elemento crucial es la capacidad que posee para ceder y aceptar electrones en un proceso continuo (Prado, *et al.*, 2012).

#### **6.3.4. Proyectos mineros de cobre en el Ecuador**

En Ecuador continúa el desarrollo del sector minero, según el Ministerio de Minería (2018) se registró al menos 17 proyectos mineros en el país, de los cuales ocho poseen una reserva de cobre. Sin embargo, se encuentran suficientemente avanzados para merecer el estatus de proyecto estratégico solamente a dos, el primero es Mirador y el segundo San Carlos Panantza, los demás se encuentran más retrasados en los estudios, como es el caso de: Cascabel, Warintza, Ruta del Cobre, Río Zarza, Cangrejos y La Bonita. En el Catálogo Minero del año 2018, los proyectos estratégicos desarrollados en el país guardan una reserva aproximada de 10 millones de toneladas de cobre.

#### **6.4. Caracterización físico-química y biológica de fuentes geotermales**

Dentro de las investigaciones actuales se puede encontrar varias aplicaciones que se da a las bacterias y microorganismos que ayudan en procesos de bioremediación y como facilitadores en procesos productivos, sin embargo, esta investigación se centra en la aplicación de bacterias resistentes, ya sean estas termófilas y acidófilas dentro del proceso de biolixiviación. El uso de bacterias de fuentes geotérmicas va más allá, desde el estudio de su diversidad microbiana hasta las aplicaciones más recientes aplicadas en el sector minero.

Primeramente es importante conocer los diversos estudios microbiológicos en el Ecuador, diferenciando totalmente los tipos de fuentes geotérmicas pues, se tiene definido tres tipos de fuentes termales, cuya formación y acidez varía notablemente, los tres tipos de fuentes termales son epitérmicas, las cuales tienen una formación superficial, con un medio ácido, mesotérmicas, las cuales tienen una formación intermedia y una acidez neutra, finalmente

la hipotérmicas cuya creación es la más profunda y su acidez es alcalina, ya que su concentración potásica es mayor.<sup>1</sup>

Investigaciones dentro del Ecuador centradas al estudio microbiológico de fuentes geotérmicas se tiene un estudio realizado por parte de Escuela Superior Politécnica del Chimborazo, debido a que la zona posee una gran actividad volcánica, y dichas aguas son destinadas para uso recreativo, medicinal y turístico, debido a su alta composición en minerales sulfúricos y ferrosos. Esto genera un gran atractivo convirtiendo a las fuentes geotérmicas como la principal matriz productiva de la zona. El trabajo de investigación tuvo como objetivo el determinar y comparar los microorganismos autóctonos y alóctonos de las aguas termales de Guapante del Cantón Píllaro, Provincia de Tungurahua, mediante el análisis microbiológico, en donde se procedió a recolectar muestras de agua de la fuente termal, en envases estériles, su cultivo se procedió hacerlo mediante de la técnica de Petrifilm, realizando diluciones de concentración de cepas para tener cepas específicas, este método se lo denomina de agotamiento debido a que al diluir la muestra se obtiene una cepa pura, la cual posteriormente se estudiaría, las cuales bajo un proceso de recuento se obtuvo una cantidad superior a 365 unidades formadores de colonias por mililitro, sin embargo luego de la dilución, las muestras llegaron a tener un promedio de 4,5 unidades formadoras de colonias por mililitro, en donde se facilitó realizar el análisis microbiológico.

Entre los microorganismos identificados se tubo:

- *Bacillus subtili*
- *Enterobacter cloacae*
- *Citrobacter amalonaticus*
- *Alcaligenes faecalis* y otros

Los cuales son considerados de origen autóctono debido a que su existencia en un medio libre no se puede dar, por otra parte, también se encontró bacterias de origen alóctono, entre las cuales se puede mencionar a:

- *Escherichia coli*
- *Leminorella grimont*
- *Afipia clevelandensis*

---

<sup>1</sup> Janina Carrillo. 2019. Ingeniera geóloga, información obtenida mediante, entrevista personal.

- *Rahnella aquatilis*
- *Staphylococcus aureus*

Las cuales, con alta tasa de patogenicidad, pueden llegar a afectar la salud de las personas que llegan a visitar los balnearios de la zona, a pesar de existir una alta temperatura, estas bacterias lograron adaptarse con facilidad. La investigación desarrollada concluye que los balnearios de aguas termales en Guapante, contienen cepas bacterianas patógenas, pero en muy bajas concentraciones, lo cual incentiva a implementar una planta de tratamiento para un adecuado uso de estos balnearios y cuidar la integridad de los turistas (Cruz, 2015).

### **6.5. Aplicación de bacterias termofílicas**

Por otra parte, en el Instituto Tecnológico de Veracruz se aislaron 15 cepas bacterianas de las aguas termales de El Carrizal en cuyas características termofílicas ayudaron a identificar bacilos Gram negativos, cuyo medio de reproducción corresponde entre los 45° C y 75°C, teniendo un óptimo crecimiento sobre los 55°C, creciendo a un pH que oscila entre 7 y 8, pues El Carrizal es una fuente mesotérmica.

Teniendo en cuenta que ciertas cepas presentan plásmidos con más de 200.000 pares de bases, se puede establecer conversiones genéticas y tratar ciertos contaminantes en fuentes hídricas y edáficas. Por ende, el agua de El Carrizal, es considerada una fuente fiable de microorganismos termófilos, pues las propiedades físico químicas de esta fuente y las características de las cepas que fueron aisladas, presentan una buena opción como candidatos hacia bioprospección sobre problemas ambientales. En esta investigación se toma en cuenta la utilización de los microorganismos termófilos como una alternativa de solución ante los derrames de petróleo y su recuperación mejorada, debido a que es una opción de remediación más económica, específica, segura y efectiva que otros procesos físico químicos que usualmente se emplean, entonces se puede decir que en base a esta investigación los microorganismos más eficaces en procesos de remediación o exposición a agentes contaminantes son aquellos que se desarrollan en ecosistemas extremos, en este caso el objetivo general de esta investigación fue aislar bacterias termófilas de la región de Veracruz y estudiar su posible aplicación en procesos de recuperación mejorada del petróleo (Rodríguez, *et al.*, 1999).

Así mismo, se han desarrollado varios ensayos por parte de investigadores brasileños en donde se puede mejorar el uso de consorcios bacterianos tanto mesofílicos como

termofílicos, los cuales se desarrollan en ambientes moderados y extremos, esto de vital importancia para la utilización de los mismos en procesos de lixiviación de un concentrado específico de sulfuro de cobre, contenido en un 30% aproximadamente en bornita ( $\text{Cu}_5\text{FeS}_4$ ) y con una concentración de 70% de calcopirita ( $\text{CuFeS}_2$ ), para la obtención de cobre. Teniendo como objetivo principal el evaluar la efectividad de los microorganismos, para poder descomponer los materiales sulfurados y lixiviar el mineral de interés, teniendo en cuenta la variación específica de ciertos parámetros como la naturaleza de la solución lixiviante, presencia de alimento para las bacterias en estudio como componente sulfurados (sulfato ferroso) y la inoculación de las cepas.

Es importante conocer que, para poder garantizar las mejores condiciones para la activación y actuación de los microorganismos, sobre compuestos mineros sulfurados se debe controlar los valores de pH, velocidad de agitación de la muestra y temperatura adecuada para la proliferación tanto de bacterias mesófilas como termófilas. En esta investigación se tiene como resultado que, mediante la acción microbiana y el uso de fertilizantes de uso agrícola con altos contenidos de Nitrógeno, Fósforo y Potasio como medio nutritivo, la extracción de cobre alcanzó un porcentaje mayor al 85% de la extracción por medios convencionales (De Barros, *et al.*, 2012).

En el año 2000, se desarrolló una investigación entre México y España en donde se determinó, que los procesos metalúrgicos de aprovechamiento de Cobre, en la actividad minera emana gran cantidad de  $\text{SO}_2$  a la atmósfera, contribuyendo con el daño que producen los gases de efecto invernadero, por ende, se promueve el uso de métodos menos dañinos con el ambiente (Rivera, *et al.*, 2000)

La recuperación de cobre con la ayuda de microorganismos, es un método significativamente bueno, ya que se tiene una tasa alta de recuperación del cobre a un mínimo costo con mayor rentabilidad y menos nocivos que procesos convencionales como los hidrometalúrgicos y pirometalúrgicos.

La biolixiviación como tal dentro de la recuperación de cobre es rentable siempre y cuando este sea extraído de un concentrado de flotación de sulfuros, en donde se puede obtener no solo cobre sino también oro, plata hierro, zinc, azufre y cobre principalmente. Esto con la intervención de bacterias mesófilas y termófilas que pueden desarrollarse con facilidad a temperaturas de entre  $35^\circ\text{C}$  y  $68^\circ\text{C}$  (Rivera, *et al.*, 2000)

En esta investigación la biolixiviación de concentrados de flotación de sulfuros de cobre, es un proceso muy complejo en donde se determinan los siguientes procesos:

1. Disolución de sulfuros secundarios de cobre, calcocita y digenita.
2. Disolución de calcopirita.

Al terminar esta investigación se concluyó que los microorganismos más rentables son de características mesófilas, las cuales fueron cultivadas en temperaturas de alrededor 35°C, las cuales alcanzaron una dilución del 80% con una concentración en la solución de 13,8 g.l<sup>-1</sup> (Rivera, *et al.*, 2000).

El proceso de biolixiviación como lo vienen recalando autores anteriores, funciona sobre componentes sulfurados, de los cuales se puede obtener algún mineral de interés como el oro, cobre o uranio, la cual representa un redito alto para las concesiones mineras que lo aplican en su proceso metalúrgico, logrando una alta eficiencia y sobre todo sin generar impactos sobre el ambiente, dado el caso de compararlos con otros métodos convencionales. Para este proceso de lixiviación biológica, el microorganismo más estudiado es *Acidithiobacillus ferroxidans*, la cual ha alcanzado una gran adaptabilidad a temperaturas y acidez extremas para lixiviar el metal de interés. Si bien es cierto existen muy pocos estudios sobre explotación de minerales de bajo valor, especialmente aquellos que no son sulfurados, sino con alto contenido de arsénico como la arsenopirita (FeAsS); pues la eliminación de arsénico en los procesos de lixiviación permitiría dar una pureza mayor al cobre, oro o uranio que se extraiga de las minas, las cuales al no trabajar adecuadamente son subexplotadas (Makita, 2004).

Esta investigación, la cual se divide en dos etapas las cuales están dirigidas a analizar la reducción de la cantidad de arsénico en concentrados complejos tanto de galena como de calcopirita, así como también generar información preliminar que permita estudios futuros sobre los procesos de biolixiviación de estos minerales.

La primera etapa, dirigida a determinar cómo influyen ciertos factores que son importantes durante el proceso de la biolixiviación del arsénico a partir de concentrados de plomo y cobre, los factores más influyentes fueron: el área superficial sobre la cual se trabaja, la densidad de la pulpa, el burbujeo continuo de dióxido de carbono y aire por separado, adición de medio de cultivo 9K (el cual contiene 3.0 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.5 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1 g de KCl, 0.5 g de K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 0.01 g de Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> por litro de agua destilada), aumento de FeCl<sub>3</sub> y dos diferentes concentraciones de la cepa

*Acidithiobacillus ferrooxidans*. Y la segunda etapa se basó con los datos de la primera etapa con el fin de diseñar un flujo continuo de biolixiviación, en donde se incentivan los procesos de fermentación incrementando la productividad y disminuyendo aún más los costos de operación, usando el mismo equipo para biolixiviar arsénico a partir de compuestos minerales complejos de plomo y cobre, de manera continua y no hasta que la cepa se termine el medio nutritivo, sino más bien hacer una recirculación sobre los nuevos concentrados minerales extraídos (Makita, 2004).

Es bueno entender que muy aparte de realizar métodos directos en campo o en laboratorios, también se han desarrollado programas tecnológicos, los cuales ayudan a determinar los factores más influyentes dentro del proceso de biolixiviación, por esta parte, Chile al ser uno de los mayores productores de cobre a nivel mundial, trabaja específicamente en explotar minerales sulfurados de baja ley por medio de biolixiviación. Esta necesidad para el país minero ha hecho necesario adquirir herramientas para poder comprender los fenómenos físico, químico y biológico que ocurren en las minas, para poder diseñar un método rentable que optimice la recuperación de cobre; para ello Anglo American posee el modelo HeapSim, el cual puede simular de manera efectiva el proceso de biolixiviación (Martínez, 2012).

El objetivo de esta investigación fue determinar adecuadamente los parámetros empíricos para poder calibrar el programa HeapSim, pudiendo así estimar la producción de cobre de las minerías Los Bronces y Collahuasi, las cuales son las concesiones con una tasa mayor de producción del mineral. Los resultados al final de la investigación, obtenidos por el programa indicaron que los parámetros más influyentes dentro del proceso de biolixiviación fueron la temperatura, la cual afecta directamente en el desarrollo de las bacterias y a la cinética de disolución de sulfuros, y la distribución de la granulometría la cual afecta al transporte de soluciones y especies bacterianas dentro de la muestra estudiada; como parámetro externo se determinó también la distancia entre los aspersores de solución ácida para lixiviar el material de interés. Conociendo así que una temperatura adecuada dentro de estas concesiones mineras rodea los 28°C, mejorando el rendimiento de las mismas hasta un 83,7% en la concesión de Collahuasi y un 60,8% en Los Bronces. No obstante, también se determinó que el incremento de población bacteriana no influye directamente en recuperar más cobre (Martínez, 2012).

Según Oarrantía (1997), Merino (1973) y Pérez, *et al.*, (2015) existen cepas estudiadas, muy importantes en los procesos metalúrgicos, una de ellas es la de *T. ferroxidans*, pues esta se caracteriza por tener una alta resistencia a iones inhibitorios de crecimiento bacteriano como el Cobre (Cu), Cadmio (Cd), y otros. Los procedimientos de propagación bacteriana se realizan generalmente con medio de cultivo 9K, adicionado Sulfato de Hierro II (FeSO), añadiendo sales del elemento a estudiar, en este caso, Cobre I (Cu<sup>+</sup>), a diferentes concentraciones. Para poder establecer las condiciones óptimas en las cuales puede desarrollarse la bacteria, así como también hasta qué punto esta, puede resistir, con respecto a la concentración de sales.

Existen investigaciones de este proceso llevadas a cabo en Chile por Huarachi, *et al.* (2017), con el propósito de recuperar cobre a partir de mineral cuarzo-pirita por biolixiviación y lixiviación química usando reactores de columna por gravedad. Para lo cual cultivaron cepas de *Acidithiobacillus ferroxidans* reduciendo las concentraciones de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O del 100%, 75%, 50%, 25%, 12,5% al 0% para la biolixiviación. Realizaron mediciones de pH, potencial redox, crecimiento de *A. ferroxidans*, concentración de Cu y Fe total. Al finalizar la biolixiviación se recuperó el 86% del cobre en 24 días frente a una recuperación del 54% de cobre en la lixiviación química. Los investigadores consideran que este procedimiento da mejores resultados cuando el tamaño de grano del mineral es menor.

#### **6.6.Mecanismos de la homeostasis del cobre en bacterias.**

El cobre es un micronutriente que actúa como un cofactor redox en los centros catalíticos de las enzimas, no obstante, de manera libre presenta un peligro potencial para las bacterias por su alta toxicidad y reactividad química, por ende, los microorganismos ejercen control sobre el transporte de Cu<sup>+</sup>, a través de diversos compartimentos, asegurando la homeostasis requerida para sintetizar cuproproteínas y evitar los efectos tóxicos sobre el microorganismo. El sistema bacteriano está altamente controlado de reguladores transcripcionales, chaperonas solubles, transportadores de membrana, quelantes y cuproproteínas, distribuidas en la bacteria (Argüello, *et al.*, 2013).

La mayoría de las cuproproteínas citoplasmáticas de metalación se encuentran en el periplasma, aunque pueden ser secretadas a través del sistema de translocación de doble arginina, las cuales adquieren al metal en el citoplasma. Por otro lado, las cuproenzimas membranales secretadas por el sistema secretor, se encargan de reconocer, quelar, guiar

y transportar a través de la membrana al cobre, las cuales se pliegan y adhieren al metal para poder ingresarlo a su sistema (González, *et al.*, 2010).

Se ha identificado cuatro familias de reguladores transcripcionales homodiméricos de detección de  $\text{Cu}^+$ , MerR (Proteína reguladora del operón de resistencia mercúrica) el cual es un activador transcripcional, mientras que CsoR (Represor transcripcional con detección de cobre), CopY (Represor transcripcional de copia) y ArsR (Regulador transcripcional de resistencia al arsénico) son represores transcripcionales (Ma, *et al.*, 2009). Proteínas de la familia MerR, similares a la CueR (Regulador transcripcional de tipo HTH), activan la transcripción de  $\text{Cu}^+$ -ATPasa y chaperonas  $\text{Cu}^+$ , en respuesta a altas concentraciones de  $\text{Cu}^+$ , ya que en niveles bajos de metales, el metalorregulador se une al ADN, reprimiendo la transcripción, así mismo cuando los niveles de  $\text{Cu}^+$  aumentan, la unión del metal a la célula induce cambios en la región de unión al ADN, mediada con una red de enlaces de hidrógeno, una vez que el sistema vuelve a la normalidad y la concentración de cobre no es nociva para el microorganismo, los genes de resistencia se regulan a niveles basales (Outten, *et al.*, 2000).

Los transportadores transmembranales de  $\text{Cu}^+$  que prevalecen en todo el reino bacteriano son las ATPasas tipo  $\text{P}_{\text{B}}$ , los cuales se caracterizan como transportadores politópicos que acoplan el flujo de salida de  $\text{Cu}^+$  unidireccionalmente a la hidrólisis de ATP (Ridge, *et al.*, 2008).

### **6.7. Medio de Cultivo.**

Dentro de varias investigaciones, una de ellas la de Merino, (1973), dentro del campo de la biolixiviación detalla la preparación de un medio de cultivo denominado Agar 9K, el cual una solución de Ácido Sulfúrico enriquecida con nutrientes primarios y Agar Agar, inocula bacterias acidófilas, no obstante, es bueno establecer medios adecuados, en el caso de que se encuentren bacterias que sobrevivan en condiciones menos extremas, para lo cual es importante el uso del agar Luria Bertani (Agar LB), esto debido a que, este se utiliza para cultivar y mantener bacterias en estudios genéticos y moleculares, sobre todo para el crecimiento de cultivos puros de cepas recombinantes. Este agar es específico para organismos auxotróficos, es decir que el agar puede ser enriquecido con cualquier otra sustancia para poder realizar un adecuado estudio microbiológico, es importante recalcar que la composición de este agar consta de caseína, y extracto de levadura, los cuales funcionan como fuente de macronutrientes, también tiene un complejo de vitamina B y cloruro de sodio para mantener el equilibrio osmótico de los organismos cultivados; para

estudios genéticos, se puede complementar al agar LB con soluciones de X-Gal, ampicilina, kanamicina y zeocina, los cuales pueden ayudar a determinar una tasa alta o baja de transformación genética (Novachem Ecuador, 2018).

## 7. Materiales y Métodos

Esta investigación se realizó en dos fases, tanto en campo como en laboratorio. La fase de campo se desarrolló en la zona de Pucará, en las mediaciones de las piscinas termales comunitarias de Timbuyacu en la Parroquia San Blas, cantón San Miguel de Urququí, provincia de Imbabura, en tres puntos distintos, los cuales son vertientes naturales de aguas termales, una de ellas, la de mayor caudal, está protegida con una estructura de concreto y llave, misma alimenta al centro recreativo, las otras dos, más pequeñas, desembocan directamente al río Huarmiyacu. En dichos puntos se procedió a tomar las muestras por duplicado, así como también caracterizar parámetros como la temperatura, pH y conductividad eléctrica.

La fase experimental se realizó en los laboratorios de Química y Biotecnología de la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra, en donde se caracterizó los componentes de las muestras de aguas termales, así como también el aislamiento, selección y aplicación de los consorcios bacterianos encontrados en las mismas.

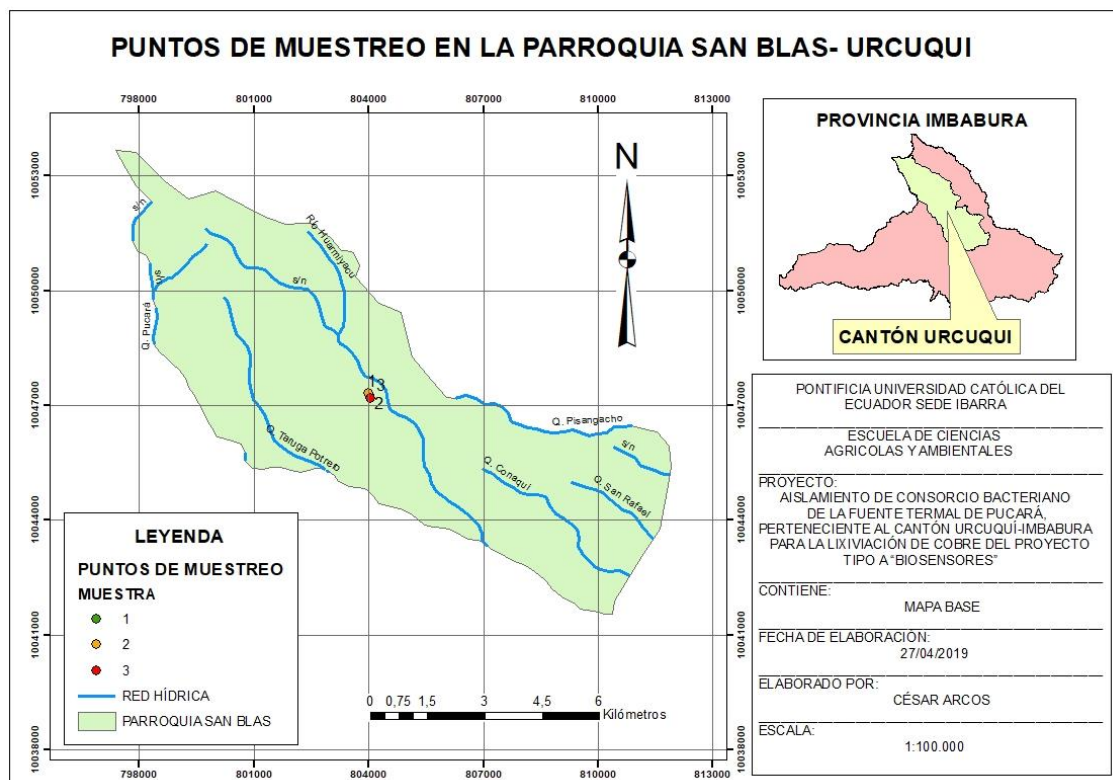


Figura 1. Tres puntos de muestreo en las vertientes de aguas termales, en la Parroquia San Blas, cantón Urququí, provincia de Imbabura. Elaborado por Arcos, C. 2019.

## **7.1. Materiales de campo**

- Cooler
- Papel toalla
- Potenciómetro (pH) LaMotte; 0.00-14.00 pH; A:  $\pm 0.01$  pH
- Mini Termómetro infrarrojo (42510); -50 – 200°C; A:  $\pm 1^\circ\text{C}$
- Conductímetro (HANNA); 0,00 – 19,99  $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ ; A:  $\pm 0,01$   $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$
- GPS Garmin 76 CSx; A:  $\pm 3,65$  m
- Cámara digital compacta SONY HX400V
- Arnés de seguridad
- Gafas de seguridad
- Mascarilla de gases con filtro
- Piola
- Alcanzador casero de madera
- Libreta de apuntes
- Agua destilada

## **7.2. Materiales y equipos de Laboratorio**

### **7.2.1. Materiales**

- Tubos de ensayo
- Cajas Petri
- Vasos de Precipitación de 250 ml
- Frascos Boheco de 100, 250 y 500 ml
- Matraz Balón aforado de 100 ml
- Matraz Erlenmeyer de 250 ml
- Pipetas de 1, 2, 5 y 10 ml
- Peras de succión
- Asa de microbiología
- Micropipeta de 1000  $\mu\text{l}$
- Merchero de Bunsen
- Desecador
- Crisol
- Agitadores inmantados
- Frascos ámbar de 750 ml.

### 7.2.2. Equipos

- Autoclave ICANClave; 100 – 150°C; A:  $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$
- Balanza digital MIDCIS; 0,00 – 300,00 g; A:  $\pm 0,01\text{g}$
- Centrifuga Labnet; 400 – 15 000 RPM; A:  $\pm 1\text{ RPM}$
- Estufa VRW Utility; 20 – 200°C; A:  $\pm 0,01^{\circ}\text{C}$
- Vortex Labnet
- Termociclador para PCR Labnet.
- Cámara de Electroforésis
- Mufla Thermolyne Thermo Scientific; 30 – 1500°C; A:  $\pm 0,01^{\circ}\text{C}$
- Incubadora de DBO Velp Scientifica; 20 – 40°C; A:  $\pm 0,01^{\circ}\text{C}$
- Shaker Incubator N-Biotek, 5 – 60°C; A:  $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ; 30 – 300 RPM; A:  $\pm 1\text{ RPM}$
- Refrigeradora de -30°C Thermo Scientific; -30 – 0°C; A:  $0,1^{\circ}\text{C}$
- Colorímetro LaMotte; A:  $\pm 2\% \text{ FS}$
- Cabina extractora Labconco
- Digestor MIDCIS
- Espectrofotómetro Spectroquant NOVA60 de Merck; A:  $\pm 0,001\text{ mg.l}^{-1}$
- Espectrofotómetro de microplacas EPOCH de Biotek
- Analizador de DBO Oxitops Velp Scientifica
- Microscopio KRÜSS; 0 - 200 $\mu\text{m}$ ; A:  $\pm 2\mu\text{m}$
- Sistemas de Electroforesis en Gel Horizontal, C.B.S. Scientific

### 7.2.3. Reactivos

- Alcohol industrial 98%
- Kit de Sulfatos (Merck); 25 – 300  $\text{mg.l}^{-1}$
- Kit de Hierro (Merck); 0,05 – 500  $\text{mg.l}^{-1}$
- Kit de Cobre (LaMotte); 0,00 – 3,5  $\text{mg.l}^{-1}$
- Kit de DQO (LaMotte); 20 – 1500  $\text{mg.l}^{-1}$
- Ácido Nítrico 65%
- Ácido Clorhídrico 98%
- Agar Luria Bertani (Merck)
- Caldo Luria Bertani (Merck)
- Estándar de Cobre II de 1000  $\text{mg.l}^{-1}$  (HACH)
- Agua destilada

- Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.02 N
- Murexida
- Negro de Eriocromo T en polvo (NET)
- Hidróxido de Sodio 1N
- Buffer pH 10
- Safranina
- Cristal violeta
- Agua destilada
- Aceite de inmersión

### **7.3. Materiales de Oficina**

- Computadora HP Pavilion
- Cuaderno de apuntes
- Marcador indeleble
- Calculadora Casio
- Programa informático ArcGis 10.5.1
- Programa estadístico GraphPad Prism 5
- Programa de genética FinchTV

### **7.4. Insumo de análisis**

- Agua termal de tres vertientes de agua dentro de Pucará

### **7.5. Metodología**

#### **7.5.1. Toma de muestras.**

El volumen de la muestra de agua se recolectó en botellas de vidrio ámbar de 750 ml, por duplicado, en los tres puntos de muestreo en el área de estudio (Pucará). Al tomar la muestra se debe homogenizar el envase y llenar completamente el mismo, evitando que ingrese oxígeno en la muestra y no se modifiquen los parámetros físicos, químicos y biológicos que se desee monitorear (Nollet, 2007).

#### **7.5.2. Medición de la Temperatura**

La medición de la temperatura (Standard Methods 2550A) se realizó con el mini termómetro infrarrojo de amplio espectro modelo 42510 debido a que los puntos de muestreo tenían difícil acceso. Para la utilización de este instrumento se debe encender el

mismo y aplastar el gatillo en dirección al lugar de muestreo, donde la luz infrarroja detectará la temperatura del área de estudio.

### **7.5.3. Medición de pH**

La determinación del pH (Standard Methods 2310A) fue realizada con el potenciómetro de pH5 del Laboratorio de análisis de agua portátil LaMotte SMART 3 de código 5-0034-01, en donde se procedió a introducir las sondas de temperatura y pH en los puntos de muestreo, previamente encerando los electrodos del equipo con agua destilada. La medición se da al detectar una diferencia de potencial de hidrogeniones de una sustancia conocida (Agua destilada) y la muestra en estudio.

### **7.5.4. Medición de conductividad**

La medición de conductividad (Standard Methods 2510A) se realizó en el área de estudio, utilizando el conductímetro de campo multi rango (HANNA). Para lo cual, se encendió el instrumento y calibró la sonda de conductividad con agua destilada para encerrar el instrumento, posteriormente se sumergió la sonda en los tres puntos de muestreo, obteniendo los datos en  $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ . La medición se efectúa al introducir el electrodo que genera un campo eléctrico, estimulando que sales y minerales formen los iones electrolíticos que permiten el paso de la corriente eléctrica.

### **7.5.5. Medición de color**

El color se midió utilizando el colorímetro LaMotte SMART 3 mediante el método 2120A sin requerimiento de reactivos, código 027 Color, el cual mide la absorbancia de una disolución en una frecuencia de luz específica, para su utilización se debe filtrar la muestra con papel filtro de poro cerrado MN 640d No. 42 antes de utilizar el equipo, obteniendo los valores del color verdadero y evitando que la turbidez de la muestra no interfiera en la medición. Luego se procede a encender el instrumento y en el menú de pruebas se selecciona la opción TODAS LAS PRUEBAS, en ella se busca el código 027 color. Se llena un tubo con agua destilada hasta la marca de 10 ml, el cual servirá como blanco, se inserta en la cámara, cierra la tapa y selecciona ESCANEAR BLANCO, se retira el tubo del colorímetro, se enjuaga el tubo con el agua filtrada de la muestra y se llena hasta la marca de 10 ml, secar y limpiar el envase con papel toalla para evitar tener resultados erróneos, insertar nuevamente el tubo con la muestra en el colorímetro, cerrar la tapa y seleccionar ESCANEAR MUESTRA, y registra el resultado en unidades de color, al finalizar el análisis se debe apagar el instrumento utilizado.

### **7.5.6. Medición de Turbidez**

Para la medición de la turbidez (Standard Methods 2130B) se empleó el Turbidímetro LaMotte 2020 *e/i*, basándose en un método nefelométrico, el cual consiste en medir la dispersión de luz por partículas superpuestas en la solución a analizar, esta mide la disminución de la transmitancia del haz de luz al atravesar la muestra de interés (Parker, S., 2002) para realizar la medición, se enciende el instrumento y con la ayuda de soluciones ya preparadas se puede medir la turbidez desde un blanco conocido de 0,00 NTU (Unidades de Turbidez Nefelométrica), se coloca el tubo con la solución conocida, se cierra la tapa y se escanea el blanco, posteriormente se llena un tubo con la solución de interés hasta la marca de 10 ml, se seca y limpia el envase con papel toalla, para evitar tener resultados erróneos, se selecciona la opción escanear muestra, obteniendo los resultados en NTU, al finalizar la medición se debe apagar el instrumento.

### **7.5.7. Medición de cobre**

Para la medición del cobre se utilizó el colorímetro LaMotte SMART 3 mediante el método de ácido bicinconínico con el código 3640-SC, el cual se basa en la conversión de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  en condiciones alcalinas, la cantidad de  $\text{Cu}^{2+}$  reducida es función de la concentración de proteínas y puede ser determinada espectrofotométricamente por un cambio de color en la solución (Johnson, 2012).

Para la medición del cobre restante en el medio de cultivo, se prende el quipo, en el menú de pruebas, se selecciona todas las pruebas, se busca el código 028 Cu BCA Tablet, en donde se llena un tubo con la solución madre de  $100 \text{ mg.l}^{-1}$  de cobre, el cual servirá como blanco, se llena un tubo con dicha muestra hasta la marca de 10 ml, se inserta el tubo en la cámara, se cierra la tapa y selecciona ESCANEAR BLANCO, en otro tubo se agrega la solución con medio de cultivo y se colocó una tableta de cobre (T-3808). Se tapa y agita vigorosamente el tubo, hasta que la pastilla de cobre quede totalmente disuelta, teniendo en cuenta que si la solución a analizar se torna de un color purpura, esta contará con cobre, al finalizar la agitación, se debe esperar dos minutos para que se estabilice la solución. Al finalizar el periodo de espera, se mezcla y se limpia el tubo contenedor, se inserta en la cámara, cerrar la tapa y seleccionar ESCANEAR MUESTRA. Obteniendo un resultado en partes por millón (ppm). Al finalizar el análisis se apaga el colorímetro.

Para tener un resultado dentro del rango de lectura en el instrumento, se hizo una disolución 0,1 ml de caldo en 10 ml de agua destilada, debido a que este tiene un rango

de medición de 0,00 a 3,5 ppm y obtener concentraciones entre 0,00 y 1,00 ppm, asumiendo que 1,00 ppm representa 100 ppm.

#### **7.5.8. Medición de Sulfatos**

Se utilizó el kit de sulfatos Merck (Standard Methods 4500-SO<sub>4</sub>), en donde, los iones sulfato reaccionan con yodato bórico liberando iones yodato. Éstos oxidan tanino a un compuesto rojo pardusco. La concentración de sulfatos se determina semicuantitativamente por comparación visual del color de la solución de medición con las zonas de color de un disco colorimétrico; para ello se debe utilizar un tubo de ensayo y agregar 2,5 ml de la muestra con una pipeta, posteriormente se agrega 2 gotas del Reactivo SO<sub>4</sub>-1, cerrar el tubo y mezclar suavemente, finalmente se agrega una microcuchara del SO<sub>4</sub>-2, se cierra el tubo y se mezcla nuevamente. Al finalizar este proceso se debe calentar el tubo durante 5 minutos a 40°C a baño María, agitando de vez en cuando, teniendo en cuenta que el tubo no debe estar cerrado completamente para evitar accidentes; luego de calentar el tubo, con la ayuda de una pipeta, se añade 2,5 ml del reactivo SO<sub>4</sub>-3 se cierra el tubo y se mezcla suavemente, terminado el proceso se filtra la muestra y se trasvasa a otro tubo con tapa rosca, en el nuevo tubo se añade 4 gotas del Reactivo SO<sub>4</sub>-4, cerrar el tubo y mezclar suavemente. Se debe calentar nuevamente el tubo por 7 minutos a baño María a 40°C agitando de vez en cuando, teniendo en cuenta que el tubo no debe estar cerrado completamente para evitar accidentes, terminado el protocolo de preparación de la solución, colocar en una cubeta de vidrio de 10 ml para medir en el Fotómetro NOVA 60 (ISO 8466-1, 1990).

#### **7.5.9. Medición de Hierro**

En la medición de este parámetro (Standard Methods 3500-Fe A), todos los iones hierro se reducen a iones hierro (II). Éstos, en medio amortiguado con tioglicolato, forman con un derivado de triazina un complejo violeta rojizo que se determina fotométricamente.

La concentración de hierro en las muestras se utilizó el kit de Hierro Merck, para lo cual se agregó 5 ml de la muestra en un tubo de ensayo con tapa rosca con la ayuda de una pipeta, posteriormente se agrega 3 gotas del reactivo Fe-1, cerrar y mezclar suavemente, al terminar de mezclar, se deja en reposo por 3 minutos y colocar en una cubeta de vidrio de 10 ml para medir en el Fotómetro NOVA 60 (ISO 8466-1, 1990).



Figura 2. Espectrofotómetro NOVA 60.  
Fuente: Arcos, C. 2019.

#### **7.5.10. Medición de DQO (Demanda Química de oxígeno)**

La medición de DQO (Demanda Química de Oxígeno) se realizó utilizando el kit de DQO para rangos altos con el colorímetro LaMotte, método 5220A, ésta es una prueba de digestión ácida que permite la oxidación de cromato a dicromato, lo cual vuelve a la solución de color naranja, esto se mide a 650 nm, lo que es directamente proporcional a la DQO de la muestra. La demanda química de oxígeno (DQO) es una medida de la cantidad sustancias en el agua susceptibles a la oxidarse por los oxidantes químicos. Para realizar esta medición se debe de homogenizar la muestra, y precalentar el digestor a  $150 \pm 2^\circ \text{C}$ . Luego se abre un tubo de DQO y se sostiene en un ángulo de  $45^\circ$  y se agrega 0,2 ml de agua de la muestra, haciendo que esta llegue al interior del tubo rozando las paredes del mismo, se tapa y se mezcla bien, se repite el procedimiento con agua destilada para realizar la medición del blanco, se coloca los tubos en el digestor precalentado por dos horas y luego se deja enfriar a temperatura ambiente, procurando que la solución esté correctamente mezclada. Al finalizar este procedimiento, se enciende el colorímetro y el menú de pruebas se selecciona todas las pruebas para buscar el código 026 COD HR, se limpia el tubo y con la ayuda del adaptador de COD, se inserta el tubo con la muestra de agua destilada en la cámara, se realiza el escaneo del blanco, posteriormente con el mismo procedimiento, se toma la medida por triplicado para tener un dato fiable, al finalizar la medición se debe apagar el equipo utilizado (Nollet, 2007).

#### **7.5.11. Medición de DBO (Demanda Biológica de Oxígeno)**

La medición de DBO (Demanda Biológica de Oxígeno), método 5210A, se realizó utilizando BOD Sensor System, la DBO es un procedimiento químico para determinar la cantidad de oxígeno disuelto que necesitan los microorganismos aeróbicos biológicos en

el agua. El análisis se produce en una muestra de agua dada a cierta temperatura durante un período específico. Se expresa más comúnmente en miligramos de oxígeno consumido por litro de muestra a la temperatura constante de 20 ° C durante 5 días de incubación (DBO5) (VELP Scientifica, 2015), en donde se procedió a agregar 43,5 ml de la muestra de agua de los puntos ya establecidos, así como también un ml de solución A, solución B, solución C y solución D o tampón, en una botella de vidrio color ámbar. Se agregó Hidróxido de Sodio, hasta la apertura de la capsula alcalina, luego se encendió los sensores de DBO y se dejó bajo un régimen respiratorio por cinco días en agitación constante a 20°C.

Las soluciones A, B, C y D contienen lo siguiente:

Solución A: 0,25 g de Cloruro férrico hexahidratado en un litro de agua destilada.

Solución B: 27,5 g de Cloruro de calcio anhidro en un litro de agua destilada.

Solución C: 22,5 g de Sulfato de magnesio Heptahidratado en un litro de agua destilada.

Solución D (solución tampón): 8,5 g de difosfato monobásico de potasio, 33,4 g de difosfato disódico heptahidratado, 21,7 g de difosfato dipotásico y 1,7 g de Cloruro de amonio, en un litro de agua destilada.

El DBO, tiene un método respirométrico, en donde mediante la agitación del medio, produce que los microorganismos, consuman el oxígeno disuelto en la muestra para poder emanar CO<sub>2</sub> y este sea captado por el medidor Oxitop.

#### **7.5.12. Dureza cálcica y magnésica**

Para obtener la dureza total (2340C) de la muestra se miden 100 ml de muestra en un balón aforado, para luego trasvasarlo a un Erlenmeyer de 250 ml añadiendo 2 ml de buffer pH 10 y una cucharada de Negro de Eriocromo T (NET), dando un color rosado, posteriormente, se titula con el EDTA 0,02 M con la ayuda de una bureta, observando un ligero cambio de color de rosa a azul purpura. La dureza cálcica (3500-Ca B) se determina midiendo 100 ml de muestra en un balón aforado, para luego trasvasarlo a un Erlenmeyer de 250 ml añadiendo 2 ml de NaOH 1N y una cucharada de murexida, dando un color rosado, por último, se titula con el EDTA 0,02 M con la ayuda de una bureta, observando un ligero cambio de color de rosa a azul purpura. Finalmente, la dureza magnésica (3500-Mg B), se realiza mediante la diferencia de la dureza total y la dureza cálcica (Bustos, 2007).

### **7.5.13. Comprobación de Recuperación de Cobre**

Para conocer la capacidad de adaptabilidad y de recuperación de cobre se aplicó el método 305-A, el cual consiste en una digestión ácida de las aguas para el total de metales recuperables o disueltos para su análisis por espectroscopía (APHA, 1992) del film bacteriano encontrado en cada tubo de ensayo y determinar la concentración final retenida en los microorganismos, mediante el tratamiento de la muestra en donde se debe tarar los crisoles utilizados a 105°C por media hora, se pesa los crisoles para posteriormente agregar el film bacteriano centrifugado y calcinarlo a 550°C en la mufla por tres horas, al terminar se enfría los crisoles en un desecador y se registra el peso nuevamente, se remueve las cenizas con un agitador de vidrio y se agrega 15 ml de ácido nítrico y 5 ml de ácido clorhídrico, dentro de la Sorbona con el fin de evitar contacto directo con los compuestos tóxicos, se mezcla con el agitador y se trasvasa la muestra a tubos de ensayo para digerir durante tres horas a 105°C, al final la digestión se deja enfriar en una gradilla, para posteriormente trasvasar a un matraz balón de 100 ml, el cual será aforado con una solución de ácido nítrico con una concentración de 0,2 N, esta solución contiene el cobre existente en el interior de las bacterias, por lo que se mediría la concentración de cobre con la ayuda del colorímetro LaMotte.

### **7.5.14. Aislamiento del consorcio bacteriano**

El aislamiento de bacterias se realizó en tubos de ensayo con caldo LB (Luria Bertani), el cual es utilizado para el desarrollo de organismos auxotróficos (Novachem Ecuador, 2018), en distintas fases, primeramente, se preparó 18 tubos con caldo LB de 9 ml cada uno, los cuales tenían una concentración de 100 mg.l<sup>-1</sup> de cobre, los tubos fueron semi cerrados con tapa rosca y esterilizados en el autoclave a 121°C por 45 minutos a una presión de 1,5 atm.

Luego de tener el material de trabajo correctamente esterilizado se colocó 1 ml de agua termal en 9 ml caldo LB, libre de cobre a una temperatura de 40°C por 24 horas, con el fin de proliferar toda la flora microbiana existente en las vertientes de las aguas termales.

Posteriormente, se tomó una muestra de cada tubo para inocularlo en cajas Petri con agar LB enriquecido con 25 mg.l<sup>-1</sup> utilizando la técnica de Spread-Plate, en donde 1 ml de la muestra se distribuye uniformemente sobre la superficie de agar y luego se incubó a 40 °C por 72 horas (Koster, 2003). Al finalizar el periodo de incubación que se obtuvo en las placas Petri, se identificó los diferentes tipos de cepas para volverlas a aislar en caldo

LB, la identificación se realizó de acuerdo a sus características morfológicas (forma, tamaño, borde, consistencia y estructura).

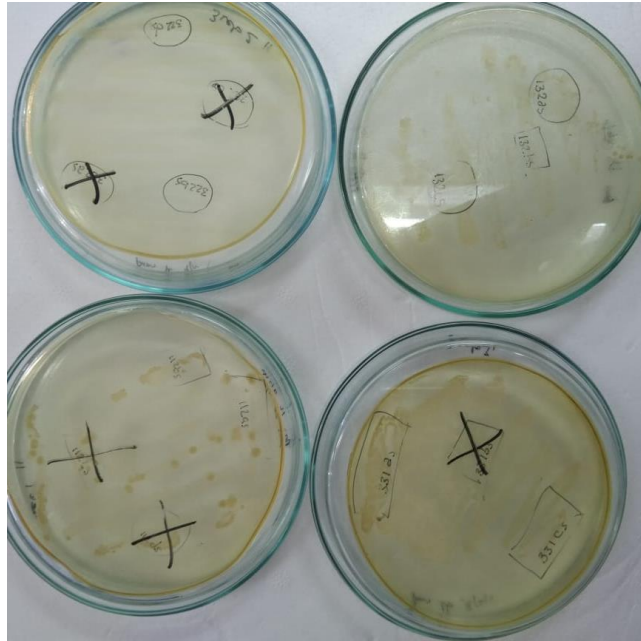


Figura 3. Identificación de colonias por sus características morfológicas.

Fuente: Arcos, C. 2019.

Al finalizar la identificación de las cepas existentes se aisló siete, inoculando en tubos de ensayo con 10 ml de caldo LB enriquecido con  $100 \text{ mg.l}^{-1}$  de cobre, la inoculación se realizó con la ayuda de un asa metálica adecuadamente esterilizada, para el estudio de caso, la concentración de cobre se tomó de los límites máximos permisibles establecidos por el TULSMA (Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente), en el Acuerdo Ministerial 097 que es de  $91 \text{ mg.l}^{-1}$  de cobre en el sector industrial.

Los parámetros de incubación para la recuperación de cobre que se tomaron en cuenta fueron: temperatura, ya que se usa bacterias de origen geotérmico con una temperatura promedio de  $40^\circ\text{C}$ , indicando que existen en el medio bacterias termófilas; acidez (3,3) ya que la solución de cobre acidificó el medio del cultivo a fin de replicar condiciones ácidas de un relave minero real y agitación (30 rpm) para impedir la creación del film bacteriano obligando a los microorganismos a recuperar más cobre y crear el film en condiciones de saturación máxima del mineral de interés (Huarachi, *et al.* 2017).

### **7.5.15. Extracción de ADN**

Para el proceso de extracción de ADN se utilizaron las cepas cultivadas en caldo LB sin concentración del metal y finalizadas las 12 horas de crecimiento.

Se trabajó con el kit comercial PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen®) el cual provee 7 reactivos (Genomic Lysis/Binding Buffer, Genomic Digestion Buffer, Wash Buffer 1, Wash Buffer 2, Genomic Elution Buffer, RNase A y Proteinase K) para la extracción del ADN.

El procedimiento se realizó siguiendo las especificaciones suministradas por el fabricante, los pasos principales son descritos a continuación:

### **7.5.16. Tinción de Gram**

Se realizó una tinción de Gram para clasificar las bacterias según su pared celular en Gram positivas y Gram negativas para elegir el protocolo de preparación de lisado apropiado.

Con la ayuda de un asa bacteriológica se extendió la muestra de la cepa bacteriana sobre el centro de un portaobjetos de vidrio, limpio y seco. Para fijar la muestra se pasó varias veces de forma horizontal por la llama del mechero, cuidando que la muestra no se quemara. Una vez fijada la cepa, se tiñó cubriéndola con cristal violeta durante 45 segundos y posteriormente se eliminó el exceso de colorante lavándolo con agua destilada. La muestra se cubrió después con lugol, se dejó reposar durante 45 segundos y se eliminó el exceso de colorante con agua destilada. Posteriormente se realizó una decoloración agregando alcohol al frotis durante 15 segundos y lavando inmediatamente. El portaobjetos con el frotis se tiñó con una solución de contraste (safranina,) dejándola reaccionar durante 45 segundos antes del último lavado. Finalmente se colocó un cubreobjetos, se agregó aceite de inmersión y se procedió a observar bajo el microscopio a 100x. Las bacterias Gram (-) se tiñen de rojo debido a la safranina, mientras que las bacterias Gram (+) se tiñen de púrpura gracias al cristal violeta (López, *et al.*, 2014)

### **7.5.17. Preparación del lisado de bacterias Gram positivas.**

Para preparar el lisado de bacterias se agregó 1,5 ml del cultivo bacteriano en un tubo Eppendorf de 2 ml y se centrifugó a 10.000 revoluciones durante 1 minuto, para formar un pellet. Una vez obtenido el pellet se resuspendió las células bacterianas en 200 µl de Lysozyme Digestion Buffer (Tris-HCl 25 mM, pH 8, 2,5 mM EDTA, Triton X - 100 al 1%) con una concentración final de Lisozima de 20 mg.ml<sup>-1</sup>. Esta solución se mezcló en el equipo de vórtex por 5 segundos y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Una vez

finalizado el proceso de incubación se añadió al preparado 20 µl de Proteinase K (suministrada con el kit) y se mezcló rápidamente por agitación, seguido de esto se colocó 200 µl Genomic Lysis/Binding Buffer (suministrado por el kit), se mezcló en el equipo de vórtex por 5 segundos y se procedió a incubar a 55 °C durante 30 minutos. Finalmente se agregó 200 µl de etanol (96-100%) y se mezcló bien hasta obtener una solución homogénea. Para la unión de ADN se transfirió 640 µl del lisado a una columna giratoria con tubo de recogida (suministrado por el kit) y se centrifugó a una velocidad de 10.000 rpm a temperatura ambiente. Se desechó el tubo de recolección y se colocó la columna giratoria en un tubo de recolección limpio suministrado por el kit de 2ml (Invitrogen. 2012).

#### **7.5.18. Lavado de ADN**

Se añadió 500 µl de Wash Buffer 1 (suministrado por el kit) a la columna giratoria con el tubo de recolección y se centrifugó a 10.000 rpm durante un minuto a temperatura ambiente. El tubo de recolección con el flujo obtenido fue descartado y se colocó la columna giratoria en un nuevo tubo de recolección, se añadió 500 µl de Wash Buffer 2 (suministrado por el kit) y se centrifugó a velocidad máxima durante 3 minutos (Invitrogen. 2012).

#### **7.5.19. Elución de ADN**

Finalizado el proceso de centrifugación se desechó el tubo de recolección y la columna giratoria fue colocada en un tubo Eppendorf estéril de 1,5 ml. Se añadió 100 µl de Genomic Elution Buffer (suministrado por el kit) en el centro de la columna giratoria y se incubó a temperatura ambiente por el lapso de un minuto, seguidamente se procedió a centrifugar a velocidad máxima durante un minuto, se descartó la columna giratoria y el ADN purificado quedó contenido en el tubo Eppendorf el cual fue refrigerado a -30 °C (Invitrogen. 2012).

#### **7.5.20. Amplificación del gen ADNr 16s**

Por medio de una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se realizó la amplificación del gen ADNr 16s. Para lo cual se utilizó los partidores universales P3 (341f) y 907r (926r) para el dominio de bacterias (Pedrosa, 1999). Para cada reacción de PCR el volumen total utilizado fue de 25 µl, para obtener así una concentración ideal de ADN de 10n molar/µl, los 25 µl se repartieron de la siguiente manera:

Tabla 1. *Reactivos utilizados para la PCR*

REACTIVOS	VOLUMEN
Taq Polimerasa	12,5 $\mu$ l
Partidores 907r (926r a una concentración de 0,10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
P3 (341f a una concentración de 0,10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
ADN	5 $\mu$ l
Agua libre de nucleasas (DNase, RNase)	5,5 $\mu$ l
VOLUMEN TOTAL	25 $\mu$ l

Fuente: Manual Invitrogen Thermo Scientific.

La amplificación del ADN fue realizada en el termociclador Multigene Optimax de Labnet. El protocolo base de amplificación en el termociclador consistió en una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos; luego 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, seguido de esto un alineamiento a 55,6 °C por 45 segundos y una elongación a 72°C por 90 segundos. Posteriormente se realizó otro proceso de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos seguido de un alineamiento a 55,6°C por 45 segundos. Como último paso se realizó una extensión final a 72°C por 90 segundos (Pedrosa, 1999)



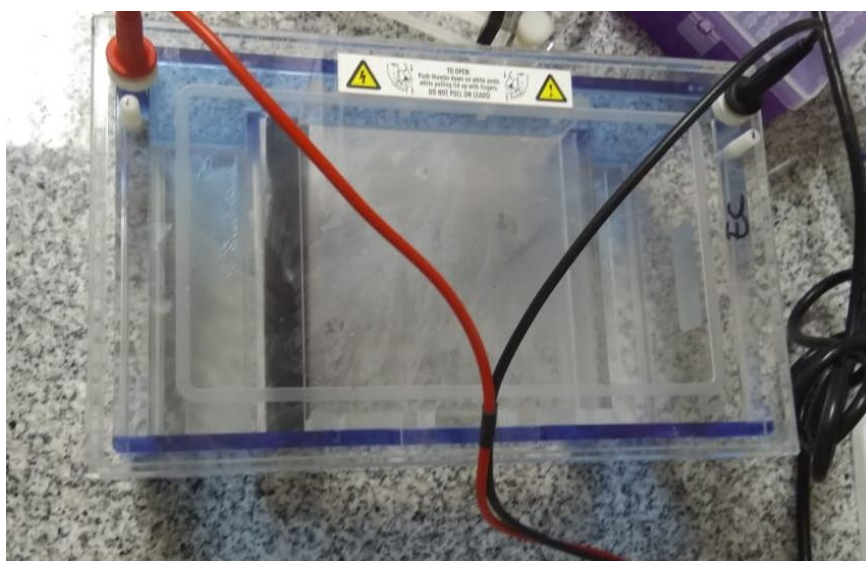
Figura 4. Termociclador para PCR.  
Fuente: Arcos, C. 2019.

### 7.5.21. Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis se realizó a los productos de amplificación de la RT-PCR del ADNc.

Las muestras mencionadas anteriormente fueron separadas en un gel de agarosa al 2% al cual se le agregó 5  $\mu$ l de Diamond™ Nucleic Acid Dye y se dejó polimerizar durante 15 minutos, una vez polimerizado el gel este fue introducido en el equipo de electroforesis, el cual posee una cámara de electroforesis cargada con buffer TAE 1X (40 mM Tris-acetato y 1mM EDTA, pH 8,3 a 25°C) (Pedrosa, 1999).

Mediante el empleo de una micropipeta se cargó en el primer pocillo del gel 5  $\mu$ l del indicador de peso molecular DNA Ladder 100bp, seguidamente fueron cargados a los pocillos restantes muestras de 8  $\mu$ l, compuestas por una mezcla de 5  $\mu$ l de los productos de la RT-PCR más 3  $\mu$ L del buffer de carga Blue/Orange Loading Dye, 6X. Una vez que todas las muestras fueron colocadas se procedió a tapan la cámara de electroforesis y se colocó los electrodos en la fuente de energía. La electroforesis fue corrida a un voltaje de 160 V (voltios) y 500 A (Amperios) durante un lapso de tiempo de 120 minutos (Pedrosa, 1999).



*Figura 5.* Electroforesis en gel de Agarosa.  
Fuente: Arcos, C. 2019.

### 7.5.22. Cuantificación de bacterias

Para la cuantificación de las bacterias tomo de cada tubo de ensayo 500  $\mu$ l en tubos eppendorf, para su inmediata refrigeración, la toma de muestras se realizó: en el momento de inocular la bacteria, a las 12, 24, 48 y 72 horas. Para posteriormente utilizar el espectrómetro EPOCH de microplacas, en las cuales se colocó 100  $\mu$ l por triplicado de cada muestra, para medir la absorbancia en un rango de 450 nm,

### **7.5.23. Análisis estadístico**

Esta investigación se realizó con un diseño completamente al azar (DCA), siete unidades experimentales, de las cuales se estudió bajo las mismas condiciones su crecimiento celular en el medio enriquecido con  $100 \text{ mg.l}^{-1}$  de cobre, como de la biolixiviación de cobre por parte de los microorganismos estudiados, obteniendo datos de los cuales se comprobó la normalidad con el test Shapiro-Wilk y la homocedasticidad con el test de Levene (Gutiérrez, 2003).

En el caso de que existía normalidad de los datos se procedió a realizar un análisis estadístico paramétrico, Análisis de Varianza por el método Tuckey (Montgomery, 2014), caso contrario se realizó las respectivas transformaciones de valor y ajustar los mismos dentro de una distribución normal (Bland y Altman, 1996).

Posteriormente se aplicó el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, para poder establecer grupos homogéneos de significancia entre las cepas estudiadas (Gutiérrez, 2003 y Montgomery, 2014).

## **8. Resultados y Discusión**

### **8.1. Caracterización física y química de las muestras.**

Los análisis realizados tanto in situ como ex situ tienen como objetivo el conocer parámetros básicos, sobre pH, conductividad, temperatura, sulfatos (SO<sub>4</sub>), hierro y cobre, los cuales fueron útiles para replicar las condiciones experimentales en el proceso de recuperación de cobre. Así mismo dicha caracterización sirvió para conocer la calidad de agua que se utiliza en el complejo turístico comunitario de aguas termales de Timbuyacu.

Se tomó en cuenta tres puntos, para su muestreo siendo el punto uno, el más representativo, para su uso recreativo, debido a que es la vertiente con más caudal y más temperatura que las otras vertientes, pudiendo así, alimentar de agua termal a las piscinas del complejo turístico comunitario Timbuyacu, el punto dos y el punto tres no abastecen de agua termal a las piscinas, por lo que estos puntos confluyen con el río Hurmiyacu.

Tabla 2. Resultados de los análisis Físico-Químicos de la muestra 1, 2 y 3

PARÁMETRO	MÉTODO	UNIDADES	PUNTO 1	PUNTO 2	PUNTO 3	NORMATIVA
<b>TEMPERATURA</b>	2550A	°C	41,4	33,4	38,9	CONDICIÓN NATURAL $\pm 3^{\circ}\text{C}$
<b>pH</b>	2310A	pH	5,90	6,32	6,24	6 - 9
<b>CONDUCTIVIDAD ELECTRICA</b>	2510A	mS.cm <sup>-1</sup>	5,90	5,06	5,33	-
<b>COLOR</b>	2120A	U	19	340	40	20
<b>TURBIDEZ</b>	2130B	NTU	39,7	116	65,3	-
<b>DBO</b>	5210A	mg.l <sup>-1</sup> (O <sub>2</sub> )	205	259	281	100
<b>DQO</b>	5220A	mg.l <sup>-1</sup> (O <sub>2</sub> )	2137	2177	421	200
<b>DUREZA TOTAL</b>	2340C	mg.l <sup>-1</sup> (CaCO <sub>3</sub> )	1208	980	1016	-
<b>DUREZA CÁLCICA</b>	3500-Ca B	mg.l <sup>-1</sup> (Ca)	262,4	124,8	211,2	-
<b>DUREZA MAGNÉSICA</b>	3500-Mg B	mg.l <sup>-1</sup> (Mg)	945,6	855,2	804,8	-
<b>SULFATOS (SO<sub>4</sub>)</b>	4500-SO <sub>4</sub>	mg.l <sup>-1</sup>	210	120	122	1000
<b>HIERRO</b>	3500-Fe A	mg.l <sup>-1</sup>	3,79	3,68	1,165	10
<b>COBRE</b>	305-A	mg.l <sup>-1</sup>	0,91	5,23	2,78	1

Nota. Datos obtenidos por: Arcos, C. 2019, comparación con la normativa vigente en el Acuerdo Ministerial 097, reforma al TULSMA, Norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes al recurso agua, para descarga en cuerpos de agua dulce.

De los parámetros tomados en cuenta, según el Acuerdo Ministerial 097, Reforma al libro vi del Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente: Norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes al recurso agua (2015), se tiene que el valor de pH, está dentro de los rangos permisible, para realizar una descarga en cuerpos de agua dulce, lo cual no representa ningún riesgo al ser utilizada de manera recreativa, por otra parte, es importante conocer que las aguas de las fuentes termales de Timbuyacu, poseen cantidades altas de hierro, cobre y azufre. Recalcando que las cantidades de cobre encontradas en el punto dos, son lo suficientemente altas para eliminar todo organismo biológico sea patógeno u otro (Organización Mundial de la Salud, 2003), haciendo del medio de extracción un lugar que puede condicionar y seleccionar bacterias o microorganismos especializados.

Estudios realizados en Chachimbiro, Imbabura, se muestra que las aguas termales provenientes del sector contienen concentraciones menores a  $0,05 \text{ mg.l}^{-1}$  de cobre,  $1,6 \text{ mg.l}^{-1}$  de hierro,  $44,2 \text{ mg.l}^{-1}$  de sulfatos a temperaturas que rodean los  $58^{\circ}\text{C}$  y con pH de 7,5 en promedio (Maposita, 2017). Así mismo estudios en Aguas Hediondas, Carchi, igualmente muestran concentraciones menores a  $0,05 \text{ mg.l}^{-1}$  de cobre,  $0,53 \text{ mg.l}^{-1}$  de hierro,  $744,8 \text{ mg.l}^{-1}$  de sulfatos a temperaturas que rodean los  $53^{\circ}\text{C}$  y con un pH de 5,6 en promedio (Rivas, 2017), estos dos puntos se consideran aguas hipertérmicas, debió a que su temperatura sobrepasa los  $37^{\circ}\text{C}$  (Gramova, *et al.* 1994).

A nivel internacional, según Cerón (1993), algunas vertientes geotermales del acuífero detrítico de Alhama de Murcia, España, presentan temperaturas que van desde los  $26^{\circ}\text{C}$  hasta los  $41^{\circ}\text{C}$ , conteniendo características de aguas hipotermales, mesotermales e hipertermales, gradualmente, así mismo se maneja un pH desde 6,8 hasta 7,9; con respecto a sus características químicas, existen concentraciones de hierro y cobre muy pobres, los cuales manejan valores de  $16,95 \text{ mg.l}^{-1}$  y  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ , respectivamente y una concentración de sulfatos de aproximadamente  $1328 \text{ mg.l}^{-1}$ .

Willis (2016), menciona que en el área protegida del Parque Provincial Copahue en Argentina, se tiene conocimiento de las características hidrogeoquímicas de cinco vertientes termales, en donde su temperatura oscila entre los  $24^{\circ}\text{C}$  y  $90^{\circ}\text{C}$ , adoptando características hipotermales, mesotermales e hipertermales, un pH ácido que varía desde 2 a 5, su concentración de sulfatos en promedio de  $1495,8 \text{ mg.l}^{-1}$ , la concentración de hierro varía mucho con valores máximos de  $119,9 \text{ mg.l}^{-1}$  y mínimos de  $1,4 \text{ mg.l}^{-1}$ , con respecto al cobre, se tiene registros inferiores a  $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ .

También existen estudios dentro del Ecuador que únicamente se tiene estimados datos puntuales con lo que respecta a temperatura y pH, por ejemplo, Arias (2016), analizó estos parámetros en las aguas termales de Papallacta, obteniendo resultados promedio de 54°C y un pH de 8,2, esto para un proceso de aislamiento bacteriano de la zona.

En la zona de El Riñón en la provincia de Azuay, también existen datos hidrogeoquímicos de aguas termales, pues Naranjo (2017), afirma que la vertiente en estudio presenta temperaturas de 32°C y 34°C con un pH de 6,5 a 7 siendo esta vertiente de características mesotermiales (Gramova, *et al.* 1994).

Según Cruz, (2015), en la zona de Píllaro, Tungurahua, las vertientes termales de Guapante, poseen características hipotérmicas con una temperatura de 26°C y un pH de 7,6, en donde estas características han permitido que cualquier tipo de organismo, pueda proliferar ocasionando molestias, infecciones e inclusive enfermedades a quienes tengan contacto con las mismas.

Al comparar el presente estudio con los anteriormente nombrados, se tiene en cuenta que dentro del sector de Pucará, existen concentraciones superiores de cobre disueltas en las aguas termales, teniendo como mínimo 0,91 mg.l<sup>-1</sup> y un máximo de 5,23mg.l<sup>-1</sup>, así mismo; en concentraciones de hierro, se registran concentraciones superiores desde 1,16 mg.l<sup>-1</sup> hasta 3,79 mg.l<sup>-1</sup> y finalmente, una concentración de sulfatos, mayor que Chachimbiro pero menor que Aguas Hediondas, con una media de 150,6 mg.l<sup>-1</sup>, estos resultados, indican que el medio contiene microorganismos que resistan la presencia de cobre en altas concentraciones, útil para el objetivo principal de esta investigación; con respecto a la temperatura, las fuente geotermiales de Pucará presentan características mesotermiales e hipertermiales, al igual que las vertientes termales anteriormente citadas, también la comparación de pH oscila entre 5,6 y 8,2, teniendo valores que se aproximan a un pH neutro.

Comparando los resultados a nivel internacional se puede decir que las fuentes geotermiales de Pucará contienen un alto contenido de cobre con respecto al acuífero detrítico de Alhama de Murcia, España y a las fuentes geotermiales del Parque Provincial Copahue, Argentina, pues en estos dos sitios se tiene un mínimo de 0,1 mg.l<sup>-1</sup>, lo cual no es significativo al comparar con la mínima concentración de 0,91 mg.l<sup>-1</sup> en Pucará. Las concentraciones de Hierro son bajas al comparar los 16,95 mg.l<sup>-1</sup> de Alhama y 119,9

mg.l<sup>-1</sup> de Copahue con un máximo de 3,79 mg.l<sup>-1</sup> de Pucará, pudiendo condicionar la existencia de bacterias ferroxidativas en el medio.

El conocer las características físico-químicas de las fuentes geotermales, es de vital importancia para poder establecer condiciones experimentales que permitan la vida de microorganismos aptos para realizar la biolixiviación, así como menciona Huarachi, *et al.* (2017), la presencia de hierro y cobre dentro de un mismo sistema, facilita la lixiviación biológica, al oxidarse el hierro presente en el medio para liberar cobre, por ende, las concentraciones altas de hierro son adecuadas, para que las bacterias autóctonas de aguas termales, funcionen como lixivadoras de cobre.

## 8.2. Caracterización biológica

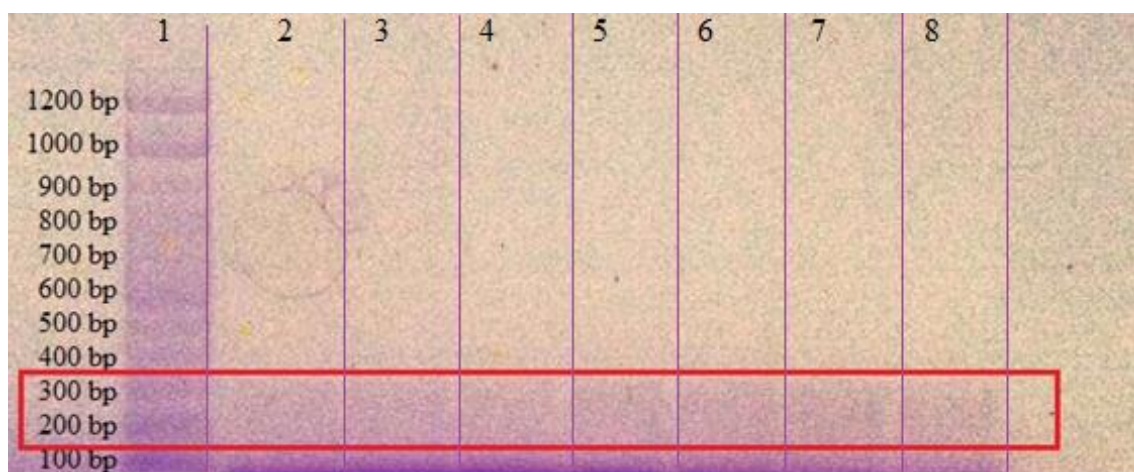


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 2%, para la caracterización de ácidos nucleicos de las cepas en estudio.

Nota: En el carril 1 se colocó el marcador molecular (100 bases pairs Ladder DNA marker) y en los carriles 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8, la amplificación del ADNr 16s de las cepas 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7.

Fuente: Arcos, C. 2019.

Luego de realizar el proceso de electroforesis, de la PCR reamplificada con ayuda de los partidores universales P3 (341f) y 907r (926r) para el dominio de bacterias. Se obtuvo un resultado de una media de 250 pares de bases (bp) aproximadamente, lo cual coincide con lo señalado por Molina (2011), pues los organismos procariotas constan de 245 pares de bases, que contienen secuencias conservativas del origen de la replicación bacteriana, este resultado señala que la mayoría de las cepas de estudio son consideradas como bacterias, las cuales fueron enviadas a Macrogen Korea Inc. para la respectiva secuenciación del ADN existentes en cada cepa.

### 8.3. Secuenciación de las cepas estudiadas

Al terminar la extracción de ADN, mediante el proceso de PCR y electroporación, se reamplificó cada una de las muestras, mismas que fueron enviadas a MacroGen Korea Inc. para su respectiva secuenciación. Al obtener los resultados de dicha empresa, se los codificó en el programa FinchTV, la cadena de nucleótidos resultante se introdujo en un lector BLAST OnLine en la página del Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estados Unidos, obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 3. *Secuencias relativamente más cercanas secuenciadas por BLAST*

CEPA	Secuencia relativa más cercana	Porcentaje de identificación	Identificación de la secuencia.	Grupo bacteriano
1	<i>Caldithrix abyssi</i>	88,89 %	CP018099.1	Calditrichaeota
2	<i>Spirochaeta thermophila</i>	86,96 %	CP001698.1	Espiroquetas
3	<i>Petrimonas sulfuriphila</i>	82,76 %	NR_042987.1	Bacteroidetes
4	<i>Flavobacterium anhuiense</i>	91,67 %	CP023642.1	Bacteroidetes
5	<i>Chloracidobacterium thermophilum</i>	92,00%	NR_074296.1	Acidobacterias
6	<i>Desulfofundulus thermosubterraneus</i>	83,78 %	NR_043639.1	Firmicutes
7	<i>Thermothelomyces thermophilus</i>	88,89 %	CP003008.1	Dikarya

Nota: Datos obtenidos por: Arcos, C. 2019.

### **8.3.1. Cepa 1.**

Según Kublanov, *et al.* (2017) mencionan que el ADN secuenciado de la cepa 1 pertenece a la bacteria *Caldithrix abyssi*, la cual fue estudiada en chimeneas hidrotermales de aguas profundas en un sitio de ventilación en la cordillera del Atlántico Medio, de características anaeróbicas, mixotróficas y termofílicas. La bacteria *Caldithrix abyssi*, puede ser incubada a una temperatura que oscila entre los 40°C y 60° C, para un crecimiento adecuado (Leibniz Institute DSMZ, 2019).

Esta bacteria posee características de quimiorganótrofo, ya que puede usar varios tipos de donantes y receptores de electrones, por lo general halotolerantes en medios ricos en sulfuros, (Alauzet y Jumas, 2014), estas características son esenciales para poder proliferar en medios como las vertientes geotermales de Pucará, así como también en el laboratorio, debido a las condiciones a las que fue sometida esta bacteria.

### **8.3.2. Cepa 2.**

Angelov, *et al.* (2010) indican que el ADN secuenciado de la cepa 2 pertenece a la bacteria *Spirochaeta thermophila*, la cual fue estudiada en aguas termales marinas en la región rusa de Kurils (Base de Datos de Diversidad Bacteriana BAC-DIVE, 2019), posee características anaeróbicas estrictas, crecen de manera óptima en un rango óptimo de 40°C a 73 °C (Lucas, 2011)

Según Angelov, *et al.* (2010) se conoce que esta bacteria ha podido crecer en celulosa y hemicelulosa, lo que significa que puede degradar estos componentes principales de la biomasa vegetal.

### **8.3.3. Cepa 3.**

Grabowski, *et al.* (2004) afirman que el ADN secuenciado de la cepa 3, pertenece a la bacteria *Petrimonas sulfuriphila*, aislada de un pozo productor de un reservorio de petróleo biodegradada en Canadá. Esta se caracteriza por su naturaleza mesófila, anaeróbica y fermentativa, crece de manera óptima entre temperaturas de 37°C y 40°C. la resistencia a los metales pesados existentes en el petróleo, otorga a la bacteria la facilidad de no solo degradar lípidos y ácidos grasos, sino también, soportar concentraciones de metales pesados y lixiviarlos.

### **8.3.4. Cepa 4.**

Según Liu, *et al.* (2008), mencionan que el ADN secuenciado pertenece a la bacteria *Flavobacterium anhuiense*, la cual fue aislada de una muestra de suelo en Anhui, China,

son células gram negativas, mesofílicas de color amarillento con flagelos, pueden desarrollarse entre temperaturas de 5°C y 37°C (Base de Datos de Diversidad Bacteriana BAC-DIVE, 2019).

### **8.3.5. Cepa 5.**

Tank y Bryant (2015) y Bryant (2007) mencionan que el ADN secuenciado pertenece a la bacteria *Chloracidobacterium thermophilum*, aislada de un cultivo de cianobacterias fototróficas de aguas termales silíceas en el Parque Nacional Yellowstone, forma cultivos bacterianos de color pardo verdoso, creciendo en rangos de temperatura que van desde los 44°C a 58°C y un pH que puede variar entre 5,5 y 9,5 siendo óptimo el de 7. Estas características acidófilas, permitirían a la bacteria adaptarse a un medio ácido y captar el cobre en una pila de biolixiviación (García, *et al.* 2011)

### **8.3.6. Cepa 6.**

Según Leibniz Institute DSMZ (2019), Kaksonen, *et al* (2006) y Watanabe, *et al.* (2018) el ADN secuenciado corresponde a la bacteria *Desulfofundulus thermosubterraneus*, las cuales fueron encontradas en una mina subterránea geotérmicamente activa en la región japonesa de Hokkaido, dicho microorganismo posee características anaeróbicas, termofílicas, formadora de endosporas y reductora de sulfato creciendo en medios con una temperatura que oscila entre los 50 °C y 72°C.

### **8.3.7. Cepa 7.**

Berka, *et al.* (2011) afirman que el ADN secuenciado pertenece al organismo *Thermothelomyces thermophilus*, los cuales se caracterizan por ser organismos eucariotas termofílicos y filamentosos, capaces de hidrolizar todos los polisacáridos principales que se encuentran en la biomasa, creciendo entre temperaturas que oscilan entre 45°C y 50°C.

En Vietnam, se han estudiado organismos termofílicos, los cuales pueden presentar grandes beneficios para la industria ya que Nguyen, *et al.* (2019), aislaron 105 cepas que lograron crecer a 50°C con un pH de 2, esto a partir de compostaje de materia vegetal, este estudio es de vital importancia, puesto que la cepa 7, fue la que más cobre recuperó en el caldo Luria Bertani, con un decrecimiento más lento que las otras cepas.

#### 8.4. Análisis estadístico del crecimiento celular y recuperación de cobre de las cepas aisladas

Tabla 4. Test de normalidad y homogeneidad de varianza para el crecimiento celular de las bacterias lixiviantes.

Test	0 horas	12 horas	24 horas	48 horas	72 horas
Shapiro-Wilk (Valor P)	0,2429	0,1855	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Levene (Valor P)	0,1663	0,4046	0,2389	0,9206	0,4889

Nota. Datos obtenidos por: Arcos, C. 2019.

Los datos obtenidos en la tabla 3, representan el valor P, tanto para normalidad con el test Shapiro-Wilk, como para homogeneidad de varianza con el test de Levene, en donde, si el valor P es mayor que el nivel de significancia 0,05, se aprueba la normalidad u homogeneidad de varianza.

En el test de Shapiro-Wilk, se obtuvo que los datos del crecimiento a las 0 y 12 horas poseen normalidad a diferencia del crecimiento a las 24, 48 y 72 horas, las cuales no se distribuyen normalmente, debido a que el valor P es inferior al nivel de significancia 0,05.

Por otra parte, se menciona que todos los datos poseen homogeneidad de varianza en su distribución ya que el valor P del test de Levene es mayor al nivel de significancia 0,05.

Para realizar el análisis de varianza, se realiza las transformaciones de los datos, que no se distribuyeron normalmente.

Tabla 5. Conversiones para el crecimiento celular por absorbancia promedio del periodo de 24 horas ( $n=3$ )

Cepa	Dato original	Arcsen $x$
C1	0,0410	2,34
C2	0,1093	3,27
C3	0,0330	1,89
C4	0,0476	2,72
C5	0,0457	2,62
C6	0,0457	2,62
C7	0,0333	1,90
Valor P	<0,0001	<b>0,5064</b>

Nota. Datos obtenidos por: Arcos, C. 2019.

Tabla 6. Conversiones para el crecimiento celular por absorbancia promedio del periodo de 48 horas (n=3)

Cepa	Dato original	Arcsen $x$
C1	0,0467	2,6700
C2	0,2136	7,4800
C3	0,0603	3,4500
C4	0,0463	2,6500
C5	0,0777	4,4500
C6	0,0747	4,2800
C7	0,0553	3,1700
Valor P	<0,0001	<b>0,0504</b>

Nota. Datos obtenidos por: Arcos, C. 2019.

Tabla 7. Conversiones para el crecimiento celular por absorbancia promedio del periodo de 72 horas (n=3)

Cepa	Dato original	Arcsen $x$
C1	0,0249	1,4200
C2	0,1192	4,8200
C3	0,0256	1,4400
C4	0,0387	2,2100
C5	0,0416	2,3800
C6	0,0217	1,2400
C7	0,0458	2,6200
Valor P	<0,0001	<b>0.0598</b>

Nota. Datos obtenidos por: Arcos, C. 2019.

Como se muestra en las tablas 4, 5 y 6, luego del análisis de conversiones (Ver Anexos 19,20 y 21), la transformación Arcsen  $x$  es la que presentó una distribución normal de los datos de crecimiento celular en un periodo de 24, 48 y 72 horas. Por lo que se puede proceder con el análisis de varianza para el crecimiento celular por absorbancia.

#### 8.4.1. Análisis de Varianza del crecimiento celular por absorbancia en el proceso de biolixiviación de cobre.

Debido a que la absorbancia del crecimiento celular tanto a las 0, 12, 24, 48 y 72 horas, presentan una distribución normal y homogeneidad de varianza, es factible realizar un análisis estadístico paramétrico (ANOVA), para poder comparar la capacidad de crecimiento y resistencia a la toxicidad que tiene cada una de las cepas ante un medio enriquecido con 100 mg.l<sup>-1</sup> de cobre.

### 8.4.1.1. Crecimiento celular a las cero horas

Tabla 8. Análisis de Varianza del crecimiento celular por absorbancia a las cero horas de incubación de las bacterias lixiviantes.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor P	Significancia
Entre grupos	$6,8 \times 10^{-6}$	6	$1,1 \times 10^{-6}$	<0,05	***
Total (correlación)	$8,9 \times 10^{-6}$	20			
C.V= 4,38% $\bar{X}$ =0,0152					

\*\*\*: Altamente significativo

Nota. Datos obtenidos por: Arcos, C. 2019.

Del análisis de varianza la de la tabla 7 se puede observar una alta diferencia significativa debido a que el valor P es menor que el límite de significancia 0,05; el coeficiente de variación fue de 4,38 % lo que determina que existe una mínima dispersión de los datos con respecto a su absorbancia promedio de 0,0152 Abs, indicando que se dan condiciones similares en el momento de incubación a las cero horas.

Según Arana *et al.* (2015) para un cultivo de *Pseudomona fluorescens* con una absorbancia de 0,5 Abs le correspondería  $3 \times 10^8$  UFC.ml<sup>-1</sup>, lo cual aplicado a esta investigación, se estima en promedio  $9,12 \times 10^6$  UFC.ml<sup>-1</sup> inicial para proliferarse en el medio enriquecido con 100 mg.l<sup>-1</sup>.

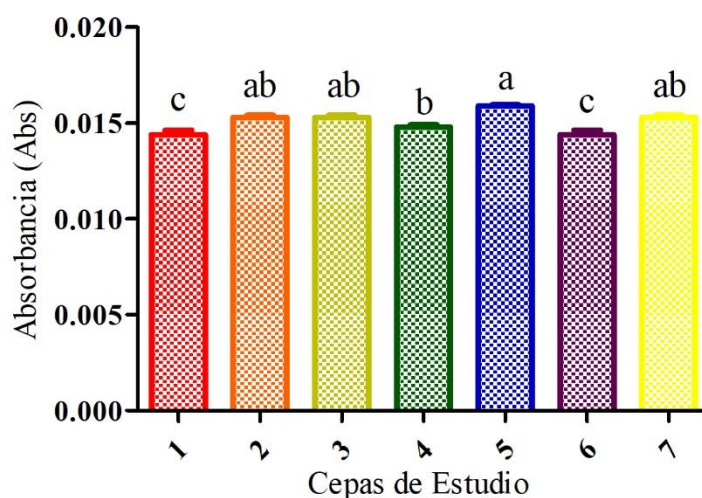


Figura 7. Prueba Tukey al 5% para el crecimiento celular a las cero horas de tratamiento  
Fuente: Arcos, C. 2019.

Como se muestra en la figura 7, la prueba Tukey al 5% se observan 4 grupos de significancia(a, b, c, ab), en donde destaca la cepa 5-a (*Chloracidobacterium thermophilum*) con una absorbancia de 0,0159 Abs que representa  $1,2 \times 10^7$  UFC.ml<sup>-1</sup>, siendo esta la cepa con una mayor cantidad de organismos iniciales que fueron monitoreados para el análisis de crecimiento celular en un medio enriquecido con 100 mg.l<sup>-1</sup> de cobre, a diferencia de las cepas 1-c (*Caldithrix abyssi*) y 6-c (*Desulfofundulus thermosubterraneus*) cuya absorbancia es la menor de los tratamientos (0,0144 Abs) representando  $1,09 \times 10^7$  UFC.ml<sup>-1</sup>, ya que existe un reducido número inicial de organismos en el medio con respecto a las otras cepas.

#### 8.4.1.2. Crecimiento celular a las 12 horas

Tabla 9. *Análisis de Varianza del crecimiento celular por absorbancia a las 12 horas de incubación de las bacterias lixiviantes.*

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor P	Significancia
Entre grupos	0,001776	6	$2,9 \times 10^{-4}$	<0,05	***
Total (correlación)	0,001787	20			
C.V.=29,39% $\bar{X}$ =0,0321					

\*\*\*: Altamente significativo

Nota. Datos obtenidos por: Arcos, C. 2019.

En el análisis de varianza la de la tabla 8 se puede observar una alta diferencia significativa debido a que el valor P es menor que el límite de significancia 0,05; el coeficiente de variación fue de 29,39 %, lo que determina que existe una dispersión considerable de los datos con respecto a su absorbancia promedio de 0,0321 Abs, debido a que los microorganismos existentes crecen de manera distinta ya que cada una de las cepas en un periodo de 12 horas, se encuentran en proceso de adaptación en un medio tóxico enriquecido con 100 mg.l<sup>-1</sup> de cobre.

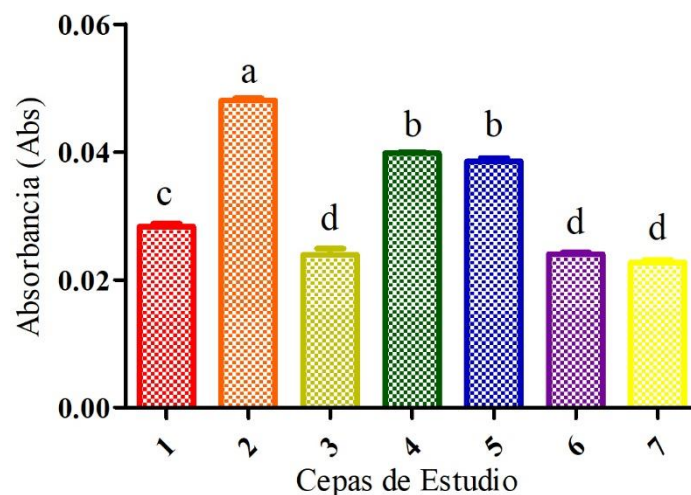


Figura 8. Prueba Tukey al 5% para el crecimiento celular a las 12 horas de tratamiento  
Fuente: Arcos, C. 2019.

La prueba Tukey al 5% se observan 4 grupos de significancia (a, b, c, d), en donde la cepa 2-a (*Spirochaeta thermophila*) con una absorbancia de 0,0481 Abs ( $2,8 \times 10^7$  UFC.ml<sup>-1</sup>), es la cepa con una mayor cantidad de proliferados a las 12 horas de incubación en un medio enriquecido con 100 mg.l<sup>-1</sup> de cobre, a diferencia de las cepas 3-d (*Petrimonas sulfuriphila*), 6-d (*D. thermosubterraneu*) y 7-d (*Thermothelomyces thermophilus*) cuyas absorbancias son las menores de los tratamientos con 0,0239 Abs ( $1,43 \times 10^7$  UFC.ml<sup>-1</sup>), 0,0240 Abs ( $1,44 \times 10^7$  UFC.ml<sup>-1</sup>), y 0,0227 Abs ( $1,36 \times 10^7$  UFC.ml<sup>-1</sup>) respectivamente, ya que la alta sensibilidad de los organismos hacia el medio no les permite proliferarse de una manera acelerada como en el caso de la cepa 2 (Figura 8).

#### 8.4.1.3. Crecimiento celular a las 24 horas

Tabla 10. Análisis de Varianza del crecimiento celular por absorbancia a las 24 horas de incubación de las bacterias lixiviantes.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor P	Significancia
Entre grupos	4,283	6	0,7139	<0,05	***
Total (correlación)	4,294	20			
C.V=29,06%		$\bar{X}=0,0508$			

\*\*\*: Altamente significativo

Nota. Datos obtenidos por: Arcos, C. 2019.

En el análisis de varianza de la tabla 9 se puede observar una alta diferencia significativa debido a que el valor P es menor que el límite de significancia 0,05; el coeficiente de variación fue de 29,06% lo que determina que existe una dispersión considerable de los datos con respecto a su absorbancia promedio de 0,0508 Abs, indicando que cada una de las cepas a las 24 horas de su incubación, son sensibles ante un medio tóxico enriquecido con 100 mg.l<sup>-1</sup> de cobre, por tal motivo, el crecimiento tiene una gran dispersión.

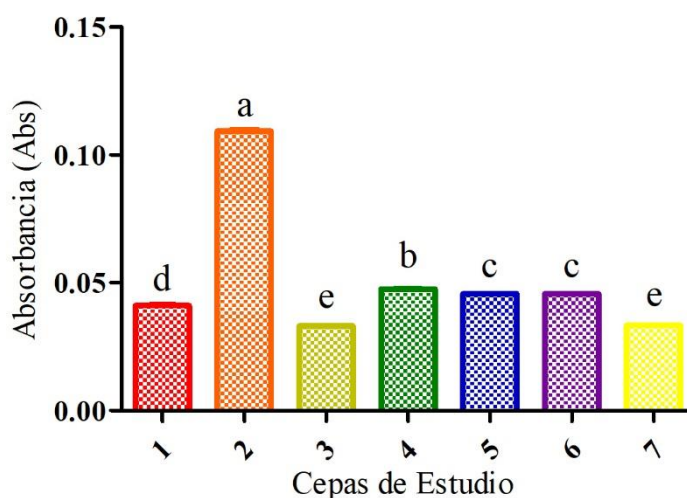


Figura 9. Prueba Tukey al 5% para el crecimiento celular a las 24 horas de tratamiento  
Fuente: Arcos, C. 2019.

Como se muestra en la figura 9, la prueba Tukey al 5% se observan 5 grupos de significancia, en donde la cepa 2-a (*S. thermophila*) con una absorbancia de 0,1093 Abs que representa  $6,5 \times 10^7$  UFC.ml<sup>-1</sup>, es la cepa con una mayor cantidad de organismos proliferados a las 24 horas de incubación en un medio enriquecido con 100 mg.l<sup>-1</sup> de cobre, a diferencia de las cepas 3-e (*P. sulfuriphila*) y 7-e (*T. thermophilus*) cuyas absorbancias son las menores de los tratamientos con 0,0330 Abs ( $1,98 \times 10^7$  UFC.ml<sup>-1</sup>) y 0,0333 Abs ( $1,99 \times 10^7$  UFC.ml<sup>-1</sup>), respectivamente, teniendo en cuenta que el periodo de adaptabilidad empieza a influir sobre los microorganismos, generando resistencia a las altas concentraciones del metal pesado en el medio.

#### 8.4.1.4. Crecimiento celular a las 48 horas

Tabla 11. *Análisis de Varianza del crecimiento celular por absorbancia a las 48 horas de incubación de las bacterias lixiviantes.*

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor P	Significancia
Entre grupos	50,91	6	8,485	<0,05	***
Total (correlación)	50,94	20			
C.V= 39,68% $\bar{X}$ =0,08208					

\*\*\*: Altamente significativo

Nota. Datos obtenidos por: Arcos, C. 2019.

En el análisis de varianza la de la tabla 10 se puede observar una alta diferencia significativa debido a que el valor P es menor que el límite de significancia 0,05; el coeficiente de variación fue de 39,68% lo que determina que existe una dispersión considerable de los datos con respecto a su absorbancia promedio de 0,08208 Abs, indicando que cada una de las cepas son sensibles ante un medio tóxico enriquecido con 100 mg.l<sup>-1</sup> de cobre, ya que unos microorganismos se proliferan con más facilidad que otros.

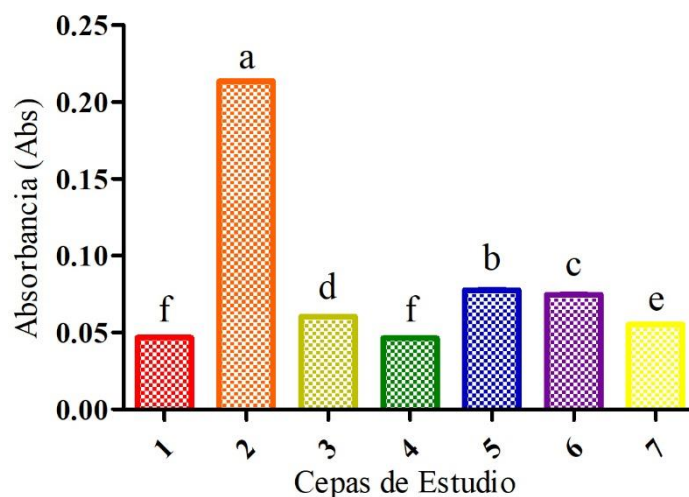


Figura 10. Prueba Tukey al 5% para el crecimiento celular a las 48 horas de tratamiento.  
Fuente: Arcos, C. 2019.

Como se muestra en la figura 10, la prueba Tukey al 5% se observan 6 grupos de significancia, en donde la cepa 2-a (*S. thermophila*) con una absorbancia de 0,2136 Abs (1,28 x 10<sup>8</sup> UFC.ml<sup>-1</sup>), es la cepa con una mayor cantidad de organismo proliferados a

las 48 horas de incubación en un medio enriquecido con 100 mg.l<sup>-1</sup> de cobre, a diferencia de las cepas 1-f (*C. abyssi*) y 4-f (*Flavoacterium anhuiense*) cuyas absorbancias son las menores de los tratamientos con 0,0467 Abs (2,8 x 10<sup>7</sup> UFC.ml<sup>-1</sup>), y 0,0463 Abs (2,77 x 10<sup>7</sup> UFC.ml<sup>-1</sup>) respectivamente, señalando que en un periodo de 48 horas, este será la absorbancia de crecimiento máximo generada por las cepas, pues en este periodo todas las cepas logran adaptarse completamente.

#### 8.4.1.5. Crecimiento celular a las 72 horas

Tabla 12. *Análisis de Varianza del crecimiento celular por absorbancia a las 72 horas de incubación de las bacterias lixiviantes.*

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor P	Significancia
Entre grupos	28,85	6	4,808	<0,05	***
Total (correlación)	28,87	20			
C.V= 51,82% $\bar{X}$ =0,04536					

\*\*\*: Altamente significativo

Nota. Datos obtenidos por: Arcos, C. 2019.

En el análisis de varianza la de la tabla 11 se puede observar una alta diferencia significativa debido a que el valor P es menor que el límite de significancia 0,05; el coeficiente de variación fue de 51,82% lo que determina que existe una dispersión considerable de los datos con respecto a su absorbancia promedio de 0,04536 Abs, indicando que cada una de las cepas son sensibles ante un medio tóxico enriquecido con 100 mg.l<sup>-1</sup> de cobre, además de mostrar un decrecimiento, se mantiene la alta dispersión de datos, debido a la resistencia adquirida en todo el periodo experimental.

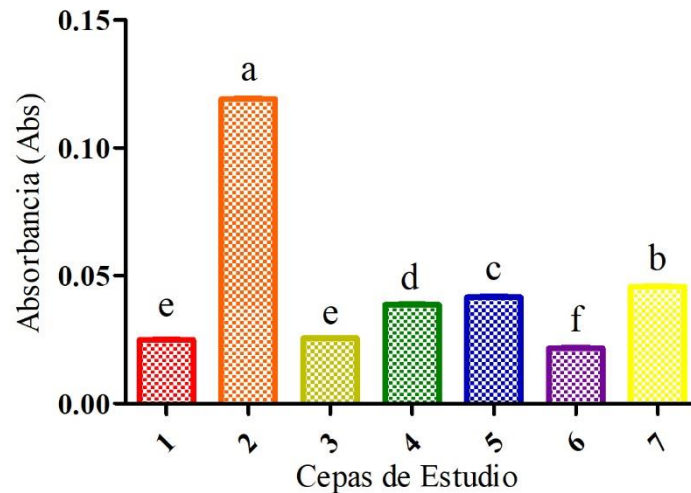


Figura 11. Prueba Tukey al 5% para el crecimiento celular a las 72 horas de tratamiento.  
Fuente: Arcos, C. 2019.

En la figura 11, la prueba Tukey detecta 6 grupos homogéneos en donde la cepa 2-a (*S. thermophila*), a pesar de tener un decrecimiento celular, presenta diferencias altamente significativas con respecto a las demás cepas debido a que esta cepa se caracteriza por tener la mayor absorbancia de crecimiento celular en el medio (0,1192 Abs) con  $7,15 \times 10^7$  UFC.ml<sup>-1</sup>, así mismo la cepa 7-b (*T. thermophilus*), ya que su leve decrecimiento a una absorbancia de 0,0458 Abs ( $2,74 \times 10^7$  UFC.ml<sup>-1</sup>), indica que los microorganismos en el medio son más resistentes que los de las otras cepas, a diferencia de la cepa 6-f (*D. thermosubterraneus*) que sufre un decrecimiento muy significativo, siendo la cepa con menor cantidad de microorganismos resistentes en un periodo de 72 horas, con una absorbancia del crecimiento de 0,0217 Abs ( $1,30 \times 10^7$  UFC.ml<sup>-1</sup>).

El coeficiente de variación alto para el crecimiento celular en las 12, 24, 48 y 72 horas, considera que las muestras son heterogéneas, según Guerra, *et al.* (2015), el coeficiente de variación puede superar hasta un 40% debido a que las células en el proceso de crecimiento, se ven influidas por las características genéticas propias y del medio, haciendo que estas desarrollen resistencia o latencia inmediata hasta adaptarse paulatinamente, crecer hasta consumir todos los nutrientes en el medio y entrar en un proceso de latencia o muerte al terminarse los mismos (Nguyen, *et al.*, 2019). Según Arana *et al.* (2015), en crecimiento o decrecimiento celular, el incrementar o disminuir un logaritmo de  $10^7$  a  $10^8$ , en un periodo de 24 horas no es representativo, debido a que

la población celular en algunos casos puede seguir creciendo, entrar en proceso de latencia o de muerte celular.

#### 8.4.1.6. Crecimiento celular total

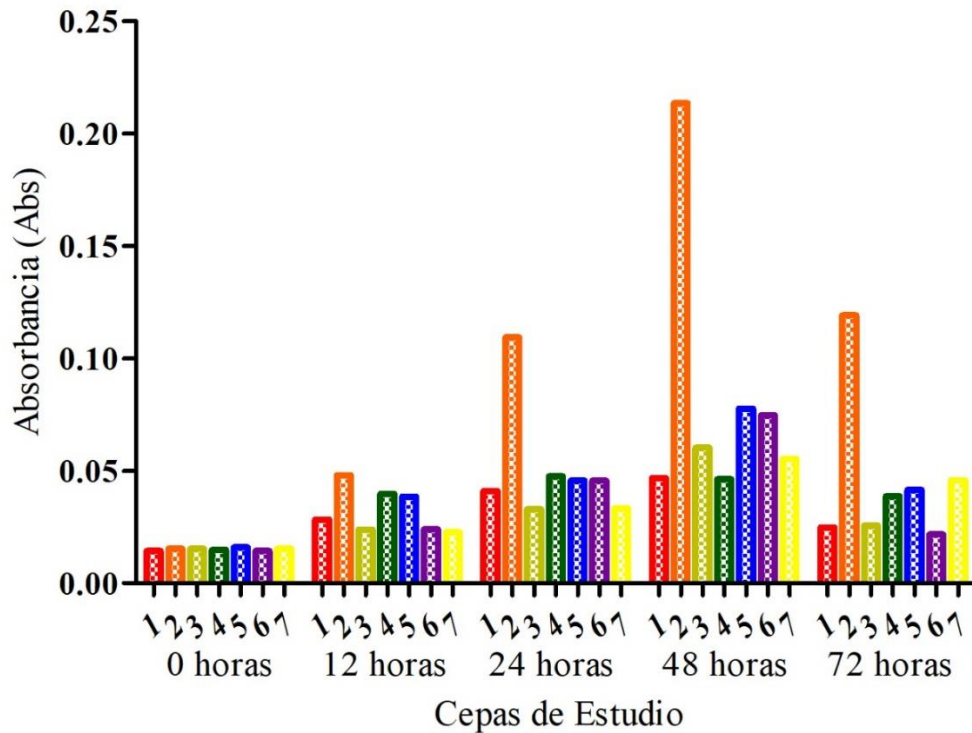


Figura 12. Comparación del crecimiento celular en los diferentes periodos de análisis, en un medio enriquecido con cobre a una concentración de  $100 \text{ mg.l}^{-1}$   
Fuente: Arcos, C. 2019.

Existe una mayor diferencia de crecimiento en las 48 horas, coincidiendo con el periodo óptimo de recuperación máxima de cobre, siendo la cepa 2, la que se adapta de mejor manera y logra proliferarse de una manera más eficiente con respecto a las otras cepas, en el periodo de tiempo ya mencionado (Figura 12)

El crecimiento bacteriano, depende de diversos factores, entre ellos la concentración de los compuestos en el medio, elementos adicionales o inclusive si el medio se presenta de manera sólida o líquida, en la presente investigación se muestra claramente que en un periodo de 48 horas de incubación, se llega a un máximo crecimiento celular, en las siete cepas estudiadas, pasado este tiempo, empieza a decrecer, debido a la saturación del metal pesado en el interior de las células y falta de nutrientes. En lo que respecta a las cepas 2 y 6 luego de llegar al máximo número de células en el medio, empiezan a disminuir rápidamente. Por otra parte, la cepa 7 tiene un crecimiento lento y no numeroso, sin embargo, es más resistente ante la presencia de cobre y no se ve afectado en la

disminución celular. Se debe tener en cuenta que en esta investigación se trabaja en un medio totalmente líquido, con una concentración igual de cobre para las tres cepas de 100 mg.l<sup>-1</sup>, un pH de 3,3 y una temperatura constante de 40°C, Martínez (2012), afirma que el crecimiento bacteriano, sea mayor o menor que no influye directamente sobre la recuperación de cobre, debido a que no todos los microorganismos poseen el mismo metabolismo, o las mismas enzimas que les permiten desarrollarse en un medio con alta toxicidad.

El presente estudio a diferencia de lo realizado por Huarachi, *et al.* (2017), en donde se estudia el crecimiento celular, en un medio sólido, ácido de pH 2,3 o menor, compuestos de hierro y sulfuros y concentraciones desde 0 mg.l<sup>-1</sup>, hasta 100 000 mg.l<sup>-1</sup>, utilizando bacterias autóctonas de relaves mineros como *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans*, las cuales tienen un crecimiento continuo en medios con partículas de 9,5mm y 19,05mm siendo el óptimo el de 9,5mm, pero el de 12,5mm llega a su máximo crecimiento celular a los 12 días y luego de ese momento empieza a decrecer.

Se debe tener en cuenta varios factores, que influyen tanto en el crecimiento celular como en la recuperación de cobre, como el pH, que, para tener una óptima biolixiviación según Misari (2016), debe estar entre 2,3 y 2,5, para extraer cobre de calcopirita, covelita, sulfuro de zinc y hierro II, así mismo en el manejo de temperatura, se tiene una extracción óptima de cobre a una temperatura óptima de 35°C. También se debe tener en cuenta que la interacción con hierro y azufre es muy importante, según Fowler y Crundell (1998). Para tener una lixiviación exitosa de minerales sulfurados, el hierro juega un papel muy importante en la biolixiviación, ya que este en su estado de oxidación III, genera cobre y hierro II, lo cual incrementa la productividad en extracción de cobre. Es importante tener en cuenta que la presencia de hierro II como fuente de energía para los microorganismos, se oxida generando hierro III, inhibiendo la disolución de los minerales en la etapa final de la lixiviación biológica (Zhou, *et al.*, 2009).

Rosell (2015), llega a tener un máximo crecimiento celular a los 60 días, realizando un conteo en cámara de Neubauer, debido al crecimiento individual que se tiene en el medio, pudiendo identificar cada organismo, mediante la utilización de un microscopio con un aumento de 40X, a diferencia de este estudio, que se alcanzó un máximo crecimiento a las 48 horas (2 días), en donde el crecimiento fue evaluado por espectrofotometría debido a que el crecimiento celular se efectuaba a manera de film, agrupando el cobre de manera

homogénea (Figura 13), esto se comprobó debido a que inicialmente el crecimiento celular se lo realizó con ayuda de una cámara de Neubauer.



Figura 13. Bacterias formando un film con el cobre recuperado, visto a través de un microscopio con aumento de 40X  
Fuente: Arcos, C. 2019.

Tabla 13. *Test de normalidad y homogeneidad para la recuperación de cobre de las bacterias lixiviantes.*

Test	12 horas	24 horas	48 horas	72 horas
Shapiro-Wilk (Valor P)	0,0555	0,4142	0,9865	0,0521
Levene (Valor P)	0,4839	0,8529	0,8668	0,8529

Nota. Datos obtenidos por: Arcos, C. 2019.

Los datos obtenidos en la tabla 12, representan el valor P, tanto para normalidad con el test Shapiro-Wilk, como para homogeneidad con el test de Levene, en donde si el valor P es mayor que el nivel de significancia 0,05, se aprueba ya sea normalidad u homogeneidad, en ambos casos se aprueba que los datos de recuperación de cobre poseen normalidad y homogeneidad en su distribución, por lo que a diferencia del crecimiento celular, estos datos no necesitan transformación alguna para realizar el respectivo análisis de varianza.

### 8.4.2. Análisis de Varianza de la biolixiviación de cobre por las cepas aisladas

Debido a que la biolixiviación de cobre tanto a las 12, 24, 48 y 72 horas, presentan una distribución normal y homogeneidad, es factible realizar un análisis estadístico paramétrico (ANOVA), para poder comparar la capacidad de recuperación de cobre que tiene cada una de las cepas ante un medio enriquecido con 100 mg.l<sup>-1</sup> del metal de interés.

#### 8.4.2.1. Recuperación de cobre a las 12 horas.

Tabla 14. *Análisis de Varianza de la recuperación de cobre a las 12 horas de incubación de las bacterias lixiviantes.*

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor P	Significancia
Entre grupos	46,29	6	7,714	0,0423	*
Total (correlación)	82,29	20			
C.V= 6,39%		$\bar{X}=31,71$			

\*: significativo

Nota. Datos obtenidos por: Arcos, C. 2019.

Como se muestra en la tabla 13, el análisis de varianza determinó que la recuperación de cobre en un periodo inicial de 12 horas tiene una mínima diferencia estadística, debido a que el valor P (0,0423) se acerca al valor de significancia 0,05. El coeficiente de variación es de 6,39%, lo que hace relación a la dispersión de datos de la recuperación de cobre en función del promedio (31,71%).

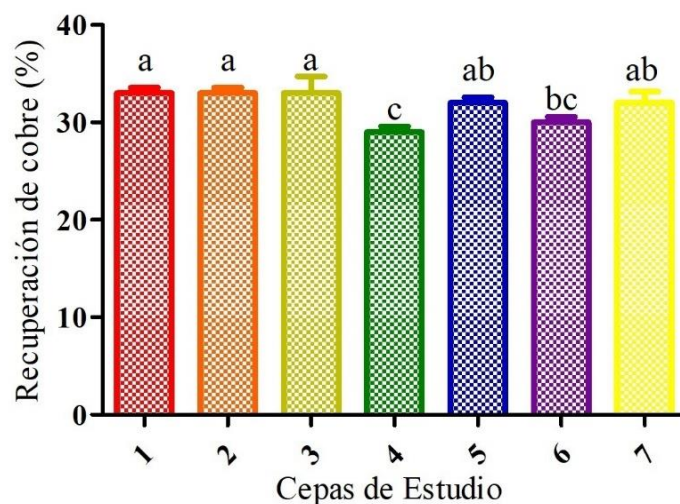


Figura 14. Prueba Tukey al 5% para la recuperación de cobre a las 12 horas de tratamiento.  
Fuente: Arcos, C. 2019.

La prueba Tukey determinó la existencia de 4 grupos homogéneos, los cuales presentan diferencias significativas mínimas ya que las cepas recuperan desde un máximo de 33% de cobre como las cepas 1-a (*C. abyssi*), 2-a (*S. sulfuriphila*) y 3-a (*P. sulfuriphila*), así mismo una recuperación mínima de 29% de cobre como la cepa 4-c (*F. anhuiense*), datos que estadísticamente son parcialmente similares (Figura 14).

#### 8.4.2.2. Recuperación de cobre a las 24 horas.

Tabla 15. Análisis de Varianza de la recuperación de cobre a las 24 horas de incubación de las bacterias lixiviantes.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor P	Significancia
Entre grupos	138,0	6	23,00	<0,05	***
Total (correlación)	176,0	20			
		C.V= 4,94%	$\bar{X}=60,00$		

\*\*\*: Altamente significativo

Nota. Datos obtenidos por: Arcos, C. 2019.

Los resultados alcanzados del análisis de varianza (Tabla 14) demostraron que la recuperación de cobre en un periodo de 24 horas presenta una diferencia altamente significativa, ya que el valor P de 0,0005, es menor que el valor de significancia 0,05.

El coeficiente de variación es de 4,94%, lo que hace relación a la dispersión de datos de la recuperación de cobre en función del promedio (60%).

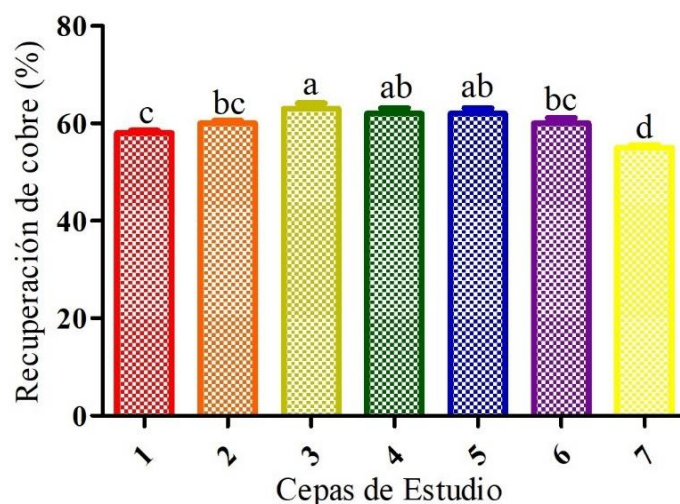


Figura 15. Prueba Tukey al 5% para la recuperación de cobre a las 24 horas de tratamiento.  
Fuente: Arcos, C. 2019.

En la figura 15 se muestra que la prueba Tukey determinó la existencia de 5 grupos homogéneos, los cuales presentan diferencias altamente significativas, entre ellas la cepa 3-a (*P. sulfuriphila*), debido a que en un periodo de 24 horas se convierte en la cepa más apta llegando a recuperar un máximo de 63% del cobre en el medio, a diferencia de la cepa 7-d (*T. thermophilus*), la cual presenta una recuperación mínima de 55% de cobre, siendo la menos apta en el mismo periodo.

#### 8.4.2.3. Recuperación de cobre a las 48 horas.

Tabla 16. Análisis de Varianza de la recuperación de cobre a las 48 horas de incubación de las bacterias lixiviantes.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor P	Significancia
Entre grupos	376,3	6	62,71	<0,05	***
Total (correlación)	396,3	20			
C.V= 5,99%		$\bar{X}=74,28$			

\*\*\*: Altamente significativo

Nota. Datos obtenidos por: Arcos, C. 2019.

Como se muestra en la tabla 15, el análisis de varianza demostró que la recuperación de cobre en un periodo de 48 horas presenta una diferencia altamente significativa, ya que el valor P de <0,0001 es menor que el valor de significancia 0,05.

El coeficiente de variación es de 5,99%, lo que hace relación a la dispersión de datos de la recuperación de cobre en función del promedio (74,28%).

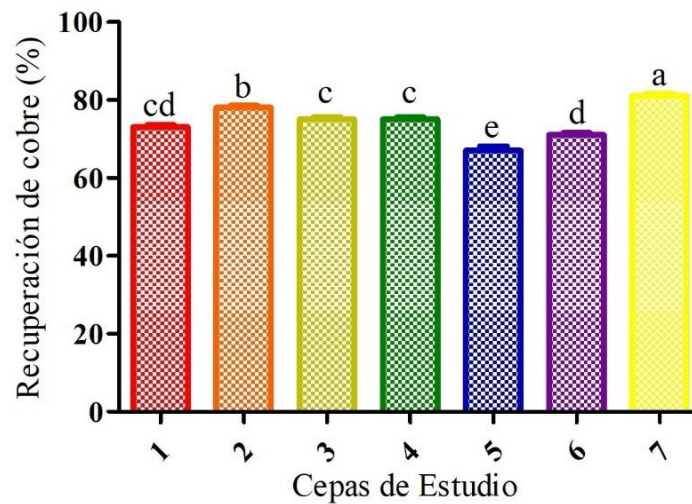


Figura 16. Prueba Tukey al 5% para la recuperación de cobre a las 48 horas de tratamiento.  
Fuente: Arcos, C. 2019.

La prueba Tukey determinó la existencia de 6 grupos homogéneos, los cuales presentan diferencias altamente significativas, entre ellas la cepa 7-a (*T. thermophilus*), debido a que en un periodo de 48 horas se convierte en la cepa más apta llegando a recuperar un máximo de 81% del cobre en el medio, a diferencia de la cepa 5-e (*C. thermophilum*), la cual presenta una recuperación mínima de 67% de cobre, siendo la menos apta en el mismo periodo (Figura 16).

#### 8.4.2.4. Recuperación de cobre a las 72 horas.

Tabla 17. Análisis de Varianza de la recuperación de cobre a las 72 horas de incubación de las bacterias lixiviantes.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Valor P	Significancia
Entre grupos	5891,14	6	981,9	<0,0001	***
Total (correlación)	5929,14	20			
C.V= 46,0% $\bar{X}$ = 37,42					

\*\*\*: Altamente significativo

Nota. Datos obtenidos por: Arcos, C. 2019.

El análisis de varianza demostró que la recuperación de cobre en un periodo de 72 horas presenta una diferencia altamente significativa, ya que el valor P de <0,0001 es menor que el valor de significancia 0,05. El coeficiente de variación es de 46,0%, lo que hace relación a la dispersión de datos de la recuperación de cobre en función del promedio (37,42%) (Tabla 16), esto debido a que las bacterias sobrepasaron su límite de crecimiento, llegando a saturarse del metal pesado en su interior, así mismo según Angelov, *et al.* (2010) y Berka, *et al.* (2011), el decrecimiento de las cepas b y a es más controlado debido a las características acidófilas y metanogénicas que poseen las mismas.

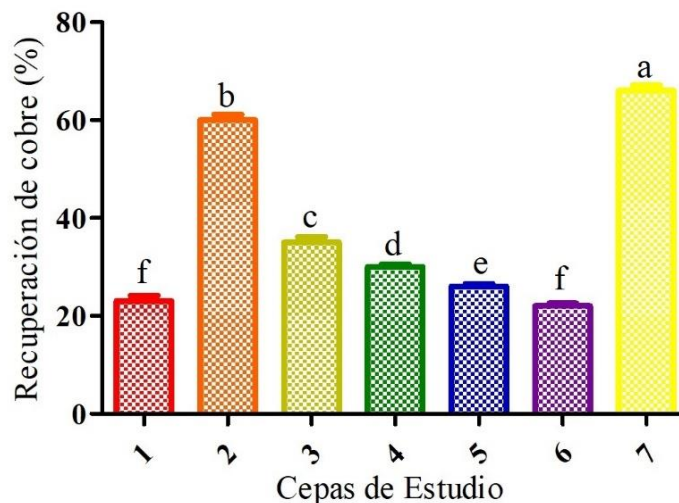


Figura 17. Prueba Tukey al 5% para la recuperación de cobre a las 72 horas de tratamiento.

Fuente: Arcos, C. 2019.

Como se muestra en la figura 17, la prueba Tukey determinó la existencia de 6 grupos homogéneos, los cuales presentan diferencias altamente significativas, entre ellas la cepa 7-a (*T. thermophilus*), debido a que en un periodo de 72 horas, a pesar de presentar un descenso en recuperación de cobre, debido al decrecimiento celular por la toxicidad del medio, se convierte en la cepa más apta llegando a recuperar un máximo de 66% del cobre en el medio, de la misma manera la cepa 2-b (*S. thermophila*), la cual llega a recuperar un máximo de 60% a pesar de presentar condiciones adversas en el medio, a diferencia de la cepas 1-f (*C. abyssi*) y 6-f (*D. thermosubterraneus*), las cuales presentan una recuperación mínima de 23% y 22% de cobre respectivamente, siendo las menos aptas en el mismo periodo.

#### 8.4.2.5. Recuperación de cobre total.

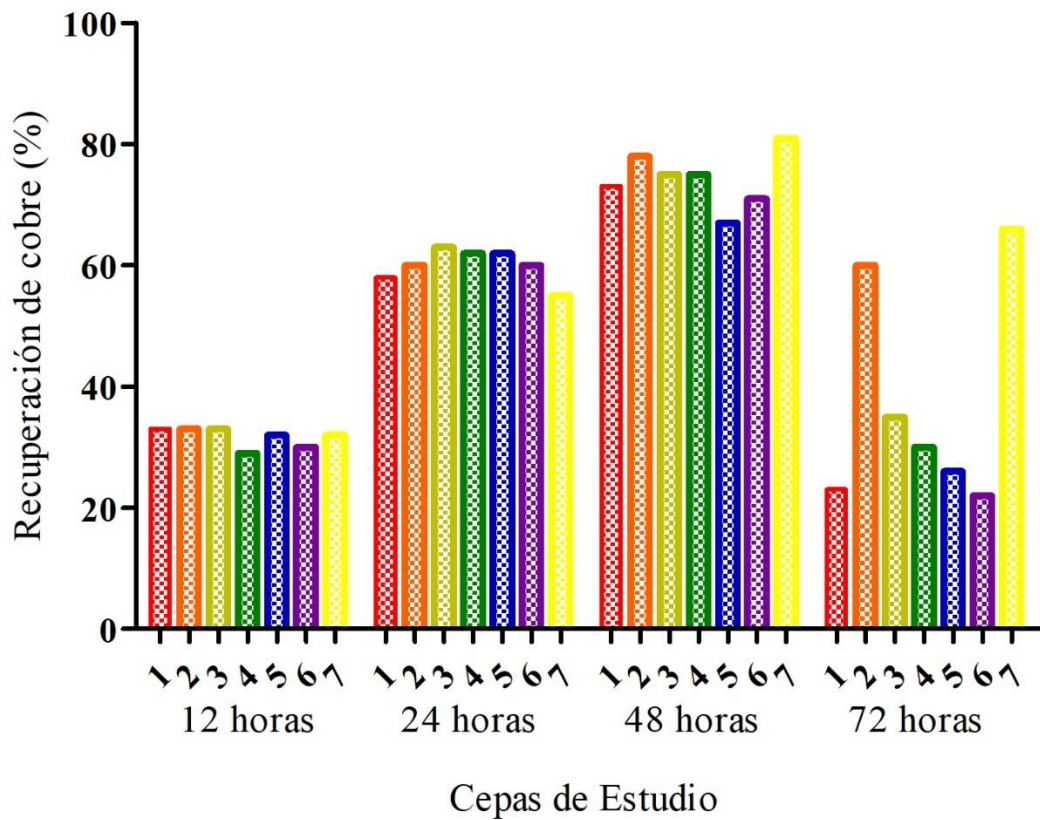


Figura 18. Comparación de la recuperación de cobre en los diferentes periodos de análisis, en un medio enriquecido con cobre a una concentración de 100 mg.l<sup>-1</sup>  
Fuente: Arcos, C. 2019.

La figura 18 muestra que existe una mayor diferencia significativa en las 48 horas y 72 horas respectivamente, siendo el periodo de 48 horas el mejor para tener una recuperación

máxima de cobre en un medio líquido, mientras que, a las 72 horas, este decrece notablemente.

En la presente investigación, el crecimiento bacteriano, no necesariamente es directamente proporcional con la recuperación de cobre, debido a que las cepas 2 y 3 no recuperaron el cobre suficiente en el periodo de 48 horas, el cual coincide con la tasa de mayor crecimiento, sino que la cepa 7 (*T. thermophilus*), a pesar de tener menor cantidad de bacterias por mililitro de caldo de cultivo, pudo recuperar un máximo de 81% de cobre a diferencia de las otras cepas que recuperaron 78% y 75%, respectivamente, teniendo en cuenta que el medio se mantuvo a una temperatura constante de 40°C a 30 rpm, un pH de 3.3, constante y únicamente enriquecido con cobre.

En el caso de Misari (2016), se tiene una recuperación de hasta un 86.7% con la ayuda de *Thiobacillus Ferrooxidans*, cultivadas en medio de cultivo 9K enriquecido con hierro II, un pH de 2 a una temperatura constante de 35°C y con agitación constante para que el medio pueda oxigenarse, teniendo en cuenta que se trabaja en periodos de 365 días.

Castro, C., (2016) mediante la utilización de *A. copahuensis*, pudo recuperar hasta un 84,4%, 83,7%, y 70,6% en los cultivos suplementados con tetrionato de potasio, con tetrionato de potasio-hierro (II) y con hierro (II), respectivamente, con un pH de 2,5 y 1,5 a una temperatura de 65°C con agitación constante de 150 RPM en un periodo de 120 días.

Martínez (2012) realizó la calibración, validación y aplicación del modelo Heapsim para estimar la producción de cobre de Los Bronces y Collahuasi, dos proyectos mineros en Chile. La autora indica que para mejorar la extracción de cobre, se debe manejar una temperatura de operación de 28°C y un pH que oscila entre 1,5 y 2,5, obteniendo así un máximo de 83,7% y 58,3% respectivamente de cobre extraído en un periodo de 400 días, utilizando los siguientes microorganismos: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Leptospirillum ferrooxidans*, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, *Sulfobacillus thermoferrooxidans*, *Leptospirillum thermoferrooxidans*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Acidianus archae*, *Metallosphaera archae*, *Sulfurococcus archae* así mismo, otros factores que influyen en este proceso son la altura de las pilas de lixiviación, las cuales no deben sobrepasar los 3 metros de altura y una aspersion de bacterias controlada cada 10 centímetros. En procesos de lixiviación

en columnas, se debe tener en cuenta la agitación, mientras que en pilas de lixiviación no es un factor significativo.

La biolixiviación con microorganismos termófilos extremos, da buenos resultados, al experimentar con cobre, como mencionan Rivera, *et al.* (2000), en un periodo de 50 días, manejando una temperatura constante de 68°C, se puede lixiviar un máximo de 73%, manejando  $1,2 \times 10^8$  células. $\text{ml}^{-1}$ , desde los 10 primeros días del experimento hasta terminar el mismo, por otra parte también se controló el medio con una temperatura de 35°C, con bacterias mesófilas, las cuales alcanzaron una lixiviación de hasta el 80% bajo las mismas concentraciones, lo que indica que las bacterias mesófilas realizan mejor lixiviación que las termófilas.

Mediante la utilización de la bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans*, utilizando un medio de cultivo 9K, llegó a recuperar hasta un 86% de cobre en un periodo de 24 días con un pH promedio de 2,0 a temperatura ambiente (25°C), modificando gradualmente el tamaño de la partícula, para lograr dicho efecto (Huarachi, *et al.* 2017).

(Alguacil, 1998), recomienda extraer cobre mediante una reacción con Ácido Sulfúrico y la aplicación de LIX 984 en queroseno para poder tener un rendimiento de entre 85% y 90%, en un periodo de 150 días, sin embargo, se deja remanentes contaminantes en los relaves mineros, así como también afectando diferentes tipos de ecosistemas.

En las investigaciones descritas la recuperación de cobre se da desde un 58,3% hasta un 90%, en donde la modificación de parámetros como la temperatura, acidez, tamaño de partícula y agitación, puede aumentar o disminuir el porcentaje de cobre recuperado, al igual que en la presente investigación, la agitación, temperatura y acidez, contribuyó a que se recupere desde un 59% hasta un 81% en un periodo mínimo de 48 horas.

## 8.5.Socialización

La investigación fue socializada en la VI Edición del Congreso Internacional de Medio Ambiente y Desarrollo “Ingeniería Ambiental, avances y desafíos de la conservación y sostenibilidad en el Ecuador”, que se realizó en la ciudad de Cuenca del 3 al 5 de abril del 2019, participando como ponente de la presente investigación el 4 de abril, misma que tuvo lugar en el teatro del Honorable Consejo Provincial de Azuay desde las 17:00 hasta las 17:20, en donde se contó con la participación de docentes, estudiantes y profesionales del Ministerio del Ambiente, Gobierno Provincial de Azuay, Universidad Central del Ecuador, Escuela Politécnica Nacional, Universidad Internacional SEK, Universidad Técnica del Norte y Escuela Superior Politécnica del Litoral.

En la ponencia se presentó la investigación realizada, la problemática en el sector minero que actualmente atraviesa el Ecuador y el uso de microorganismos de origen geotermal, como alternativa ecológica para la extracción de cobre de las concesiones mineras dedicadas a la explotación de cobre, sin alterar de manera negativa recursos como el aire, agua y suelo principalmente seguido de los objetivos propuestos, la metodología aplicada, los resultados obtenidos y las conclusiones a las que se llegó.

El proyecto de investigación tuvo una gran acogida por los asistentes, lo cual se evidenció en la tabulación de las encuestas realizadas, siendo estos los resultados más relevantes, se obtuvo que un 85% de los encuestados consideran que el tema investigado posee relevancia para algún actor y/o sector de la sociedad, un 73% considera que la investigación posee perspectivas para estudios complementarios, un 92% cree que esta investigación, genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización, empresa pública o privada, comunidad o institución y en función de los objetivos propuestos en la investigación de conformidad a un nivel muy alto, las personas encuestadas respondieron que se los cumplió en un 96% (Ver Anexo 30).

## 9. Conclusiones

- Se logró aislar un consorcio bacteriano de las aguas termales provenientes de Pucará, cantón Urcuquí, provincia de Imbabura, para la lixiviación de cobre, encontrándose 7 cepas lixiviantes, con un rendimiento óptimo de 73% (cepa 1), 78% (cepa 2), 75% (cepa 3), 59% (cepa 4), 67% (cepa 5), 71% (cepa 6) y 81% (cepa 7), aprobando así la hipótesis nula, la cual menciona que se puede recuperar cobre en condiciones de laboratorio con ayuda de bacterias geotermales.
- Se caracterizó las muestras de agua termal, las cuales, la vertiente uno presentó parámetros más altos con respecto a temperatura (42,4°C), pH (5,90), conductividad (5,90 mS.cm<sup>-1</sup>), dureza total (1208 mg.l<sup>-1</sup>), dureza cálcica (262,4 mg.l<sup>-1</sup>), dureza magnésica (945,6 mg.l<sup>-1</sup>), concentración de hierro (3,79 mg.l<sup>-1</sup>) y sulfatos (210 mg.l<sup>-1</sup>). La vertiente dos obtuvo los parámetros más altos con respecto a color (340 u), turbidez (116 NTU), DQO (2177 mg.l<sup>-1</sup>) y cobre (5,23 mg.l<sup>-1</sup>); la vertiente tres finalmente contaría con la DBO (281 mg.l<sup>-1</sup>), como su único parámetro más alto. Tomando así a la vertiente uno como la más apta para contener microorganismos que pueden ser aplicados en la industria minera, por sus características físico-químicas.
- La caracterización biológica se realizó mediante la amplificación del gen ADNr16s, obteniendo seis cepas bacterianas: *Caldithrix abyssi* (cepa 1), *Spirochaeta thermophila* (cepa 2), *Petrimonas sulfuriphila* (cepa 3), *Flavobacterium anhuiense* (cepa 4), *Chloracidobacterium thermophilum* (cepa 5), *Desulfofundulus thermosubterraneus* (cepa 6) y *Thermothelomyces thermophilus* (cepa 7), de las cuales, mediante estrés químico y su respectiva aplicación en un medio enriquecido con 100 mg.l<sup>-1</sup> de cobre, la cepa 7 (*Thermothelomyces thermophilus*) presentó un rendimiento óptimo de 81%, la cepa 2 (*Spirochaeta thermophila*) presentó un rendimiento de 78% y la cepa 3 (*Flavobacterium anhuiense*) un rendimiento de 75% en la recuperación de cobre, en un periodo mínimo de 48 horas.
- Se socializó en la VI Edición del Congreso Internacional de Medio Ambiente y Desarrollo “Ingeniería Ambiental, avances y desafíos de la conservación y sostenibilidad en el Ecuador”, presentando gran interés por parte de profesionales del sector minero, del sector biotecnológico y ambiental.

## 10. Recomendaciones

- Realizar investigaciones similares, tomando en cuenta la riqueza geotermal de la provincia, así como también el campo de aplicación de microorganismos existentes en dichas fuentes.
- Se debe tener en cuenta la agitación, ya que es un factor muy importante en procesos de lixiviación, debido a que se oxigena el medio, evita que se formen biofilms, actúa directamente sobre el crecimiento microbiológico y recupera de manera más eficiente el mineral de interés.
- Estudiar la cepa *Thermothelomyces thermophilus*, con concentraciones más elevadas de cobre, para determinar su eficacia de recuperación y su posible aplicación industrial.
- Las cepas aisladas, pueden ser utilizadas para la elaboración de biosensores sensibles al cobre, como fuente de contaminación para cuerpos hídricos cercanos a zonas mineras.
- La minería en el Ecuador puede aprovechar los recursos genéticos de las vertientes geotermales, para lixiviar cobre, sin la necesidad de utilizar agentes químicos como ácido sulfúrico, cianuro e inclusive mercurio, evitando daños a recursos como agua, suelo y aire, así como también la integridad y salud de los trabajadores en las concesiones mineras.

## 11. Referencias

- Acuerdo Ministerial 097. (2015). Sustitución del libro VI del Texto Unificado de Legislación Secundaria. Quito. Ecuador. Recuperado de: [http://gis.uazuay.edu.ec/ierse/links\\_doc\\_contaminantes/REGISTRO%20OFICIAL%20387%20-%20AM%20140.pdf](http://gis.uazuay.edu.ec/ierse/links_doc_contaminantes/REGISTRO%20OFICIAL%20387%20-%20AM%20140.pdf)
- Alauzet C. y Jumas E. (2014) The Phylum Deferribacteres and the Genus *Caldithrix*. En: Rosenberg E., DeLong EF, Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (eds) Los procariontes. *Springer*, Berlín, Heidelberg. 595-611. Doi: [https://doi.org/10.1007/978-3-642-38954-2\\_162](https://doi.org/10.1007/978-3-642-38954-2_162)
- Alguacil, F. J. (1998). La recuperación de cobre mediante lixiviación-extracción con disolventes-electrólisis: hacia el siglo XXI. *Revista de Metalurgia*. 32 (6), 400 – 407. doi: 10.3989/revmetalm.1996.v32.i6.888
- Angelov, A., Liebl, S., Ballschmiter, M., Bomeke, M., Lehmann, R., Liesegang, H., Daniel, R., y Liebl, W. (2010). Secuencia del genoma del polisacárido degradante, termofílico anaerobio *Spirochaeta thermophila* DSM 6192. *Journal of Bacteriology* 192(24). 6492-6493. Doi: 10.1128 / JB.01023-10
- APHA, (1992). Método 305-A, Digestión ácida de las aguas para el total de metales recuperables o disueltos para su análisis por FLAA o ICP espectroscopía. Estados Unidos.
- Arana, I., Orruño, M. y Barcina, I. (2015). Capítulo 5: Caracterización Microbiológica. Repositorio Institucional de la Universidad Nacional de la Plata. Argentina.
- Araya, M., Olivares, M., Pizarro, F., Llanos, A., Figueroa, G. y Uauy R. (2004). Community-based randomized double-blind study of gastrointestinal effects and copper exposure in drinking water. *Environ Health Perspect* 2004; 112(10):1068-1073
- Argüello, J., Raimunda, D., y Padilla, T. (2013). Mecanismos de la homeostasis del cobre en bacterias. *Fronteras en microbiología celular y de infecciones*, 3(73). doi: 10.3389 / fcimb.2013.00073

Arias, F. (2016). *Aislamiento e identificación de bacterias termófilas de la fuente geotermal Papallacta* (Tesis de Grado). Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Sangolquí, Ecuador.

Base de Datos de Diversidad Bacteriana (BAC-DIVE), (2019). Navegador de Taxonomía. Recuperado de: <https://bacdive.dsmz.de/strain/14323>

Base de Datos de Diversidad Bacteriana (BAC-DIVE), (2019). Navegador de Taxonomía. Recuperado de: <https://bacdive.dsmz.de/index.php?search=Flavobacterium%20anhuiense>

Berka R., Grigoriev I., Otiillar R., Salamov A., Grimwood J., Reid I., Ishmael N., John T., Darmond C., Moisan M., Henrissat B., Coutinho P., Lombard V., Natvig D., Lindquist E., Schmutz J., Lucas S., Harris P., Powlowski J., Bellemare A., Taylor D., Butler G., de Vries R., Allijn I., van den Brink J., Ushinsky S., Storms R., Powell A., Paulsen I., Elbourne L., Baker, S., Magnuson J., Laboissiere S., Clutterbuck A., Martínez D., Wogulis M., de Leon A., Rey M. y Tsang A.. (2011). Análisis genómico comparativo de los hongos termofílicos degradantes de la biomasa *Myceliophthora thermophila* y *Thielavia terrestris*. *Nature Biotechnology*. 29(10). 922-927. Doi: 10.1038 / nbt.1976.

Bland, J. y Altman, D. (1996). Notas estadísticas: Transformación de datos. *The BMJ*. doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.312.7033.770>. 312-770

Bryant, D., Costas, A., Maresca, J., Chew, A., Klatt, C., Bateson, M., Tallon, L., Hostetler, J., Nelson, W., Heidelberg, J. y Ward, D. (2007). *Candidatus Chloracidobacterium thermophilum*: Un *Acidobacterium* aerotrópico fototrófico. *Science* 317(5837). 523-526. Doi: 10.1126 / science.1143236

Bustos, F. (2007). *Manual de Gestión y Control Ambiental*. Industria gráfica. Ecuador

Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estado Unidos (2019). Navegador de Taxonomía. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=880073>

Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estado Unidos (2019). Navegador de Taxonomía. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=665571>

Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estado Unidos (2019). Navegador de Taxonomía. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=285070>

Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estado Unidos (2019). Navegador de Taxonomía. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=459526>

Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estado Unidos (2019). Navegador de Taxonomía. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=458033&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>

Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estado Unidos (2019). Navegador de Taxonomía. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1121432>

Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estado Unidos (2019). Navegador de Taxonomía. Recuperado de: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=573729>

Cerón, J., Pulido, A. y Padilla, A. (1993). Caracterización hidroquímica y análisis de los estados de equilibrio termodinámico en aguas termominerales de Alhama de Murcia (Murcia, España). *Estudios geológicos*. 49(1-2). 49-61

Cervantes, C., Espino-Saldaña, A., Acevedo-Aguilar, F., León-Rodríguez, I., Rivera-Cano, M., Avila-Rodríguez, M., . . . Rodríguez-Zavala, J. (2006). Interacciones microbianas con metales pesados. *Revista latinoamericana de microbiología*, 48(2), 203-210.

CODELCO. (2017). Biolixiviación. (Informe de Sustentabilidad). Recuperado de: [https://www.codelco.com/biolixiviacion/prontus\\_codelco/2011-02-18/091203.html](https://www.codelco.com/biolixiviacion/prontus_codelco/2011-02-18/091203.html)

Cruz Calero, V. M. (2015). *Estudio microbiológico de las aguas termales de Guapante ubicado en la parroquia de San Andrés perteneciente al cantón Santiago de Pillaro-Tungurahua*. (Tesis de grado). Escuela Superior Politécnica del Chimborazo. Chimborazo, Ecuador

- De Barros, R., Ferreira, S., Silva, G., Cesario, I. y Gonzaga, L. (2012). Bio-Lixiviación De Concentrado De Flotación De Sulfuros De Cobre En Sistema De Reacción En Barcada Utilizando Microorganismos Mesófilos y Termófilos. *DYNA*, 79 (172), 1-9
- Español Cano, S. (2012). Contaminación con mercurio por la actividad minera. 2012, 32(3), -297. doi:10.7705/biomedica.v32i3.1437
- ESPECTRUM TECHNOLOGIES, INC., 2004. Manual de Uso. Indiana. Estados Unidos.
- Fowler, T. y Crundwell, F. (1998). Lixiviación de sulfuro de zinc por *Thiobacillus ferrooxidans*. Los experimentos con un potencial redox controlado no indican un mecanismo bacteriano directo. *Microbiología Aplicada y Ambiental*. 64 (10), 3570-3575.
- García, A., Tsukatani, Y., Romberger, S., Oostergetel, G., Boekema, E., Golbeck, J. y Bryant, D. (2011). Análisis ultraestructural e identificación de las proteínas de la envoltura de los clorosomas " *Candidatus Chloracidobacterium thermophilum*". *Sociedad Americana de Revistas de Microbiología*. 193(23). 6701–6711. Doi: 10.1128/JB.06124-11
- Gonzaga L. (2011). Procesos biohidrometalúrgicos: un enfoque práctico. Centro de tecnología mineral - CETEM, Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación. – MCTI. Rio de Janeiro, Brasil
- González, M., Raimunda, D., Cheng, X. y Argüello, J. (2010), Distintos roles funcionales de ATPasas de efusión / salida de  $\text{Cu}^+$  en *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiología Molecular*, 78: 1246-1258. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07402.x
- Gramova, V., Nelubin, V. y Yuriev, V. (1994). Clasificación de las aguas minerales adoptada en Russia y su estandarización. *32<sup>do</sup> Congreso de la I.S.M.H.* 99-102.
- Guerra, M., Pérez, Z., Cárdenas, T., Ariocha, A., Castillo, A. y Casas, X. (2015). Morphometry and morphology of the celular endothelium. *Revista Cubana de Medicina*. 28(3): 366-373.
- Gutiérrez, H. (2003). Análisis y Diseño de Experimentos. México, México: McGraw-Hill.

- HANNA instruments, (1995). Manual de instrucciones de conductímetro portátil multi rango. Padua. Italia.
- Huarachi, R., Dueñas, A., Yapo, U., Manuel, D., Lazarte, A., Mogrovejo, G., Taco, H. y Esparza, M. (2017). Biolixiviación de mineral cuarzo por *Acidithiobacillus ferrooxidans* en reactor de columna por gravedad. *Revista de Metalurgia*. 53(2): e096. doi: <http://dx.doi.org/10.3989/revmetalm.096>
- Illesca, R. (2017). Perspectivas del sector minero del Ecuador. Ministerio de Minería del Ecuador.
- Invitrogen. (2012). PureLink® Genomic DNA Mini Kit. *Life Technologies*. Recuperado de: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/purelink\\_genomic\\_man.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/purelink_genomic_man.pdf)
- ISO 8466-1. (1990). Calidad del agua. Calibración y evaluación de métodos analíticos y estimación de las características de rendimiento. Parte 1: Evaluación estadística de la función de calibración lineal. Recuperado de: <https://www.iso.org/standard/15664.html>
- Johnson, M. (2012). Cuantificación de proteínas. New Jersey. Estados Unidos Doi: [//dx.doi.org/10.13070/mm.es.2.115](http://dx.doi.org/10.13070/mm.es.2.115). Recuperado de: <http://www.labome.es/method/Protein-Quantitation.html>
- Kaksonen, A., Spring, S., Schumann, P., Kroppenstedt, R. y Puhakka, J. (2006). *Desulfotomaculum thermosubterraneum* sp. nov., un reductor de sulfato termófilo aislado de una mina subterránea ubicada en un área geotérmicamente activa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56(11). 2603-2608. Doi: 10.1099 / ijs.0.64439-0.
- Koster, W., Egli, T., Ashbolt, N., Botzenhart, K., Burlion, N., Endo, T., Grimont, P., Guillot, E., Mabilat, C., Newport, L., Niemi, M., Payment, P., Prescott, A., Renaud, P. y Rust, A. (2003). Evaluación de la seguridad microbiana del agua potable: mejora de enfoques y métodos. OCDE, Organización Mundial de la Salud; Ginebra, Suiza.
- Kublanov, I., Sigalova, O., Gavrilov, S., Lebedinsky, A., Rinke, C., Kovaleva, O., Chernyh, N., Ivanova, N., Daum, C., Reddy, T., Klenk, H., Spring, S., Goker, M., Reva, O., Miroshnichenko, M., Kyprides, N., Woyke, T., Gelfand, M., y Bonch, E. (2017). Análisis genómico de *Caldithrix abyssi*, la bacteria termófila anaeróbica de

- la novela del filo bacteriano Calditrichaeota. *Frontiers in Microbiology*. 8(1). 1-195.  
doi: 10.3389 / fmicb.2017.00195
- LaMotte, (2012). Manual de Operaciones del Colorímetro SMART 3. Chestertown.  
Estados Unidos.
- LaMotte, (2014). Manual de operaciones de Laboratorio de análisis de agua portátil  
SMART (1951-02). Texas. Estados Unidos.
- Lee, Y. N. (2003). Calcite production by *Bacillus amyloliquefaciens* CMB01. *The journal  
of Microbiology*, 41(4), 345-348.
- Leibniz Institute DSMZ. (2019). Colección alemana de microorganismos y cultivos  
celulares. Recuperado de: [https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-  
13497.html](https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-13497.html)
- Leibniz Institute DSMZ. (2019). Colección alemana de microorganismos y cultivos  
celulares. Recuperado de: [https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-  
16057.html](https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/DSM-16057.html)
- Liu, H., Liu, R., Yang, S., Gao, W., Zhang, C., Zhang, K. y Lai, R. (2008).  
*Flavobacterium anhuiense* Sp. nov., aislado del suelo del campo. *International  
Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58(4). 756-760. Doi: 10.1099  
/ ijs.0.65536-0
- López, G., García, M., Grima, O., Ballesteros, N. y Pérez, G. (2001). Técnicas de  
Biorrecuperación in situ en acuíferos contaminados por metales pesados.  
*Investigación, gestión y recuperación de acuíferos contaminados*, 233-243.
- López, L., Hernández, M., Colín, C., Ortega, S., Cerón, G. y Franco, R. (2014) Las  
tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Medigraphic*. 3(1). 10-18. Doi:  
ir-2014/ir141b
- Lorca Muñoz, X. M. (2005). *Análisis de aguas minerales y termales de la novena y  
décima región de Chile*. (Tesis de grado). Universidad Austral de Chile. Valdivia,  
Chile. Recuperado de:  
<http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2005/fcl865a/doc/fcl865a.pdf>
- Lovera, D., Arias, V., Quiñones, J., Puente, L., Landauro, C., Pillaca, M. y Medina, J.  
(2010). Cinética de la reacción de cementación de cobre a partir de minerales

- sulfurados del Complejo Marañón. *Revistas de investigación UNMSM*. 13 (26), 1-10.
- Lucas, S., Lapidus, A., Bruce, D., Goodwin, L., Pitluck, S., Peters, L., Kyrpides, N., Mavromatis, K., Ivanova, N., Mikailova, N., Pagani, I., Chertkov, O., Detter, J., Tapia, R., Han, C., Land, M., Hauser, L., Markowitz, V., Cheng, J., Hugenholtz, P., Woyke, T., Wu, D., Spring, S., Merkhoffer, B., Schneider, S., Klenk, H. y Eisen, J. (2011). El genoma completo de *Spirochaeta thermophila* DSM 6578. Base de Datos EMBL. Recuperado de: <https://www.uniprot.org/proteomes/UP000007254>
- Ma, Z., Jacobsen, F. y Giedroc, D. (2009). Coordinación química del transporte y detección de metales bacterianos. *Revisiones Químicas*, 109 (10), 4644-4681. doi: 10.1021 / cr900077w
- Makita Aguilar, M. A. (2004). *Biolixiviación de Metales en Minerales con Arsenopirita Mediante Cepas de Acidithiobacillus ferrooxidans en Cultivo Continuo*. (Tesis doctoral). Centro de Investigación en Materiales Avanzados. Chiguagua, Mexico. Recuperado de: [https://cimav.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1004/58/1/Tesis Mario Antonio Makita Aguilar .pdf](https://cimav.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1004/58/1/Tesis_Mario_Antonio_Makita_Aguilar.pdf)
- Maposita, M. (2017). *Identificación de bacterias, microalgas y hongos termófilos de la fuente geotermal "Chachimbiro" mediante técnicas microbiológicas y moleculares* (Tesis de Grado). Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, Sangolquí, Ecuador.
- Martínez, M. (2012). *Calibración, validación y aplicación del Modelo Heapsim para estimar la producción de cobre de los Bronces y Collahuasi*. (Tesis de Grado). Universidad de Chile, Santiago de Chile, Chile.
- Merino, L. (1973). Aislamiento y caracterización de Bacterias en aguas de la Mina de Ratores y su comportamiento con pirita. Recuperado de la Junta de Energía Nuclear. Madrid, España
- Ministerio de Minería. (2018). Ecuador Catálogo Minero. República del Ecuador. Quito.
- Misari, F., (2016). BIOLIXIVIACIÓN, Tecnología de la Lixiviación Bacteriana de Minerales. IAKOB Comunicadores y Editores S.A.C. Lima. Perú. 89-101

- Montgomery, D. (2014). *Diseño y análisis de experimentos*. (2a. ed. México), México: Limusa Wiley
- Naranjo, Y. (2017). *Identificación de bacterias, hongos y algas mesófilos y termófilos de las fuentes geotermales: El Riñón-provincia del Azuay y Guapán-provincia del Cañar* (Tesis de Grado). Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Sangolquí, Ecuador.
- Newman, D. K. (2010). Revisión de Experiencias en biolixiviación en Perú y Chile. *Biominería y Biotecnología*. Recuperado de: [www.biometalurgia.pe](http://www.biometalurgia.pe)
- Nguyen, V., Nguyen, T., Huong, H., Hien, D., Hang, D., Kim, D., Hüttner, S., Larsbrink, J. y Olsson, L. (2019). El estudio de hongos lignocelulolíticos termofílicos tolerantes a los ácidos en Vietnam revela una sorprendente diversidad genética. *Scientific Reports*. 9(3674). Doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40213-5>
- Nollet, L. (2007). *Manual de análisis de agua: Análisis Bacteriológico del Agua*. Segunda Edición, Reino Unido. *Taylor and Francis*.
- Novachem Ecuador. (2018). Agar Luria Bertani Miller. Novachem del Ecuador. Av. Real Audiencia N66-97 y de los Eucaliptos. Quito, Ecuador. Recuperado de: <http://www.novachem.com.ec/producto/agar-luria-bertani-miller/>
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2003). *Copper in drinking-water*. Documento de referencia para la elaboración de las Guías de la OMS para la calidad del agua potable. Ginebra - Suiza: Organización Mundial de la Salud (WHO/SDE/WSH/03.04/88).
- Orrantía, E. (1997). *Aislamiento y caracterización de cepas de Thiobacillus ferrooxidans con alta resistencia a arsénico y su utilización en la recuperación de oro a partir de concentrados de pirita y arsenopirita*. (Tesis de Doctor en Ciencias con especialidad en Biotecnología). Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, México.
- Outten, F., Outten, C., Hale, J. y O'Halloran, T. (2000). Activación transcripcional de un Escherichia coli cobre eflujo regulón por el homólogo cromosómico MerR, CueR. *Journal of Biological Chemistry*. 275(40), 31024–31029. Doi: 10.1074 / jbc.M006508200

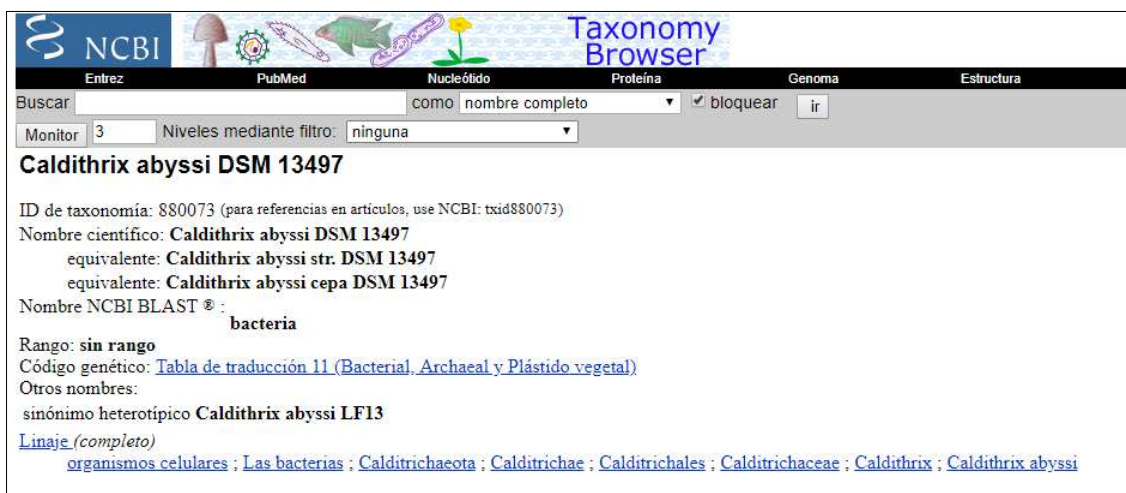
- Parker Sybil, P. (2002). Diccionario de química. McGraw-Hill. Nueva York. Estados Unidos. Sexta edición. <http://www.metas.com.mx/guiametas/La-Guia-MetAs-10-01-Turbidez.pdf>
- Pedrosa, A., (1999). Reacción en cadena de Polimerasa. *Revista Scielo*. 3(2). Versión Online ISSN 1025-0255. Recuperado de: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1025-02551999000200011](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-02551999000200011)
- Pérez N., Vásquez A. y García I. (2015), Adaptación de la bacteria *acidithiobacillus ferrooxidans* a partir de drenajes ácidos de minas de carbón para su uso en la recuperación de oro diseminado en concentrados gravimétrico. Universidad Francisco de Paula Santander. Recuperado de: <https://ww2.ufps.edu.co/>
- Pérez, Bustamante y Ponce. (2016). Historia de las normas mineras en Ecuador. Recuperado de: <http://www.pbplaw.com/historia-de-las-normas-mineras-en-ecuador/>
- Porro, S., Boiardi, J., y Tedesco, P. (1988). Biolixiviación de minerales argentinos de cobre. *Revista de Metalurgia (Madrid)*, 24.
- Prado, V., Vidala, R. y Durán, C. (2012). Aplicación de la capacidad bactericida del cobre en la práctica médica. *Revista Médica de Chile* 140, 1325-1332.
- Programa Internacional de Seguridad de las Sustancias Químicas (IPCS). (1998). Criterios de Salud Ambiental. Serie OMS N°20: Ginebra – Suiza.
- Rawlings, D. E. (1998). Industrial practice and the biology of leaching of metals from ores The 1997 Pan Labs Lecture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 20(5), 268-274. doi:10.1038/sj.jim.2900522
- Ridge, P., Zhang, Y., y Gladyshev, V. (2008). Los análisis genómicos comparativos de los transportadores de cobre y los cuproproteomas revelan la dinámica evolutiva de la utilización del cobre y su vínculo con el oxígeno. *PloS ONE* , 3 (1), e1378. doi: 10.1371 / journal.pone.0001378
- Rivas, R. (2017). *Aislamiento e identificación de bacterias, microalgas y hongos termófilos de la fuente geotermal “Aguas Hediondas, ubicada en la provincia del Carchi, cantón Tulcán, Ecuador* (Tesis de Grado). Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. Sangolquí, Ecuador.

- Rivera, R., Ballester, M., Blázquez, L. y Gonzáles, F. (2000). Lixiviación microbiológica de un concentrado de calcopirita a 35° y 68°C. In U. N. A. M. y U. C. de Madrid (Ed.) (p. 94). México D.F., México.
- Rodríguez, C., Alfaro, G. y Oliart, R. (1999). Aislamiento y caracterización parcial de microorganismos de aguas termales del carrizal y su aplicación potencial en la recuperación mejorada del petróleo.
- Rodríguez, L. y Thelma, W. (2009). Estudio de la remoción vía microbiana de Ni y Va presentes en catalizadores gastados.
- Rohwerder, T., Gehrke, T., Kinzler, K. y Sand, W. (2003). Bioleaching review Part A: Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Microbiología Aplicada y Ambiental*. 63 (3), 239–248.
- Rosell, L. (2015). *Identificación molecular y adaptación al CuS de un consorcio bacteriano termófilo aislado en el campo geotermal del Valle de Colca, Arequipa-Perú*. (Tesis de Grado). Universidad Católica de Santa María, Arequipa, Perú.
- ROTH. (2015). Ficha de Seguridad de Cobre. Unión Europea, Madrid, España.
- Suárez, P. y Reyes, R. (2002). La incorporación de metales pesados en las bacterias y su importancia para el ambiente. *Interciencia*, 27 (4), 160-164.
- Tank, M., y Bryant, D. (2015). *Chloracidobacterium thermophilum* gen. Nov., Sp. Nov.: una acidobacterium clorofotoheterotrófica microaerófila anoxigénica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 65(5). 1426-1430. Doi: 10.1099 / ijs.0.000113
- VELP Scientifica, (2015). Demanda Bioquímica de Oxígeno. Milano Italia. Recuperado de:  
[https://www.velp.com/euroNet/contenuti/image/thumb/VELP\\_BOD\\_Sensor\\_Leaflet.pdf](https://www.velp.com/euroNet/contenuti/image/thumb/VELP_BOD_Sensor_Leaflet.pdf)
- Volesky, B. (2007). Biosorption and me. *Water Research*, 41(18), 4017-4029. doi:10.1016/j.watres.2007.05.062
- Vullo, D. L. (2003). Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Química viva*, 2(3).

- Wang, C. L., Michels, P. C., Dawson, S. C., Kitisakkul, S., Baross, J. A., Keasling, J. D., y Clark, D. S. (1997). Cadmium removal by a new strain of *Pseudomonas aeruginosa* in aerobic culture. *Microbiología Aplicada y Ambiental*, 63(10), 4075-4078.
- Watanabe, M., Kojima, H. y Fukui, M. (2018). Revisión de *Desulfotomaculum* especies y propuesta de los géneros *Desulfallas* gen. nov., *desulfofundulus* gen. nov., *desulfofarcimen* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 68 (9). 2891-2899. Doi: 10.1099 / ijsem.0.002915.
- Watling, H. (2006). The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides — A review. *Hydrometallurgy*, 84(1), 81-108. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.hydromet.2006.05.001>
- WBMS, World Bureau of Metal Statistics, (2008). Consumo de cobre a nivel mundial. Reino Unido.
- Willis, G. (2016). *Biorremediación de metales pesados por sulfidogénesis utilizando comunidades y microorganismos sulfato reductores* (Tesis doctoral). Universidad de La Plata. La Plata, Argentina.
- Zhou, H., Zeng, W., Yang, Z., Xie, Y. y Qiu, G. (2009). Biolixiviación de concentrado de calcopirita mediante un cultivo moderadamente termofílico en un reactor de tanque agitado. *Bioresour. Tech.* 100 (2), 515–520. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.06.033>.

## 12. Anexos

### Anexo 1. Identificación taxonómica de la cepa 1



The screenshot shows the NCBI Taxonomy Browser interface. At the top, there are navigation tabs for Entrez, PubMed, Nucleótido, Proteína, Genoma, and Estructura. The search bar contains the text 'Caldithrix abyssi' and the search criteria are set to 'como nombre completo'. The search results display the following information:

**Caldithrix abyssi DSM 13497**

ID de taxonomía: 880073 (para referencias en artículos, use NCBI: txid880073)  
Nombre científico: **Caldithrix abyssi DSM 13497**  
equivalente: **Caldithrix abyssi str. DSM 13497**  
equivalente: **Caldithrix abyssi cepa DSM 13497**  
Nombre NCBI BLAST®: **bacteria**

Rango: **sin rango**  
Código genético: [Tabla de traducción 11 \(Bacterial, Archaeal y Plástido vegetal\)](#)  
Otros nombres:  
sinónimo heterotípico **Caldithrix abyssi LF13**  
[Linaje \(completo\)](#)  
[organismos celulares](#) ; [Las bacterias](#) ; [Calditrichaeota](#) ; [Calditrichae](#) ; [Calditrichales](#) ; [Calditrichaceae](#) ; [Caldithrix](#) ; [Caldithrix abyssi](#)

Fuente: Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estado Unidos (2019)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=880073>

### Anexo 2. Identificación taxonómica de la cepa 2



The screenshot shows the NCBI Taxonomy Browser interface. At the top, there are navigation tabs for Entrez, PubMed, Nucleótido, Proteína, Genoma, Estructura, and PMC. The search bar contains the text 'Spirochaeta thermophila' and the search criteria are set to 'como nombre completo'. The search results display the following information:

**Spirochaeta thermophila DSM 6192**

ID de taxonomía: 665571 (para referencias en artículos, use NCBI: txid665571)  
Nombre científico: **Spirochaeta thermophila DSM 6192**  
equivalente: **spirochaeta thermophila str. DSM 6192**  
equivalente: **Spirochaeta thermophila cepa DSM 6192**  
Nombre NCBI BLAST®: **espiroquetas**

Rango: **sin rango**  
Código genético: [Tabla de traducción 11 \(Bacterial, Archaeal y Plástido vegetal\)](#)  
[Linaje \(completo\)](#)  
[organismos celulares](#) ; [Las bacterias](#) ; [Espiroquetas](#) ; [Espirochaetia](#) ; [Spirochaetales](#) ; [Espirochaetaceae](#) ; [Espirochaeta](#) ; [Spirochaeta thermophila](#)

Fuente: Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estado Unidos (2019)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=665571>

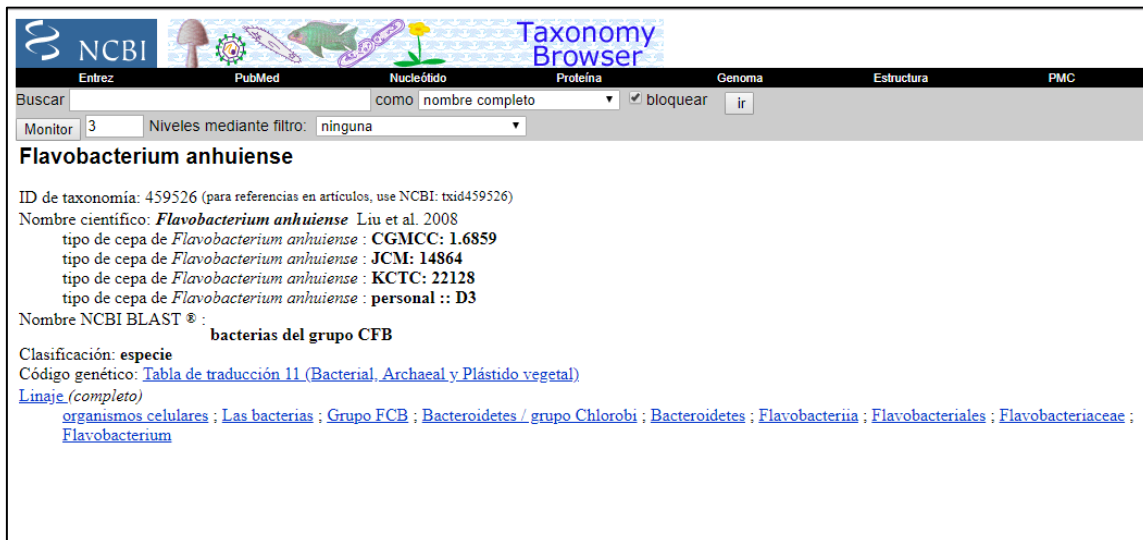
### Anexo 3. Identificación taxonómica de la cepa 3



The screenshot shows the NCBI Taxonomy Browser interface. At the top, there are navigation tabs for Entrez, PubMed, Nucleótido, Proteína, Genoma, Estructura, and PMC. Below these is a search bar with the text 'como nombre completo' and a 'bloquear' checkbox. The search results for 'Petrimonas sulfuriphila' are displayed. The taxonomic ID is 285070. The scientific name is *Petrimonas sulfuriphila* Grabowski et al. 2005. The strain type is DSM: 16547. The JCM number is 12565. The personal ID is BN3. The NCBI BLAST name is 'bacterias del grupo CFB'. The classification is 'especie'. The genetic code is 'Tabla de traducción 11 (Bacterial, Archaeal y Plástido vegetal)'. The lineage is 'organismos celulares ; Las bacterias ; Grupo FCB ; Bacteroidetes / grupo Chlorobi ; Bacteroidetes ; Bacteroidia ; Bacteroidales ; Porphyromonadaceae ; Petrimonas'.

Fuente: Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estado Unidos (2019)  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=285070>

### Anexo 4. Identificación taxonómica de la cepa 4



The screenshot shows the NCBI Taxonomy Browser interface. At the top, there are navigation tabs for Entrez, PubMed, Nucleótido, Proteína, Genoma, Estructura, and PMC. Below these is a search bar with the text 'como nombre completo' and a 'bloquear' checkbox. The search results for 'Flavobacterium anhuiense' are displayed. The taxonomic ID is 459526. The scientific name is *Flavobacterium anhuiense* Liu et al. 2008. The strain type is CGMCC: 1.6859. The JCM number is 14864. The KCTC number is 22128. The personal ID is D3. The NCBI BLAST name is 'bacterias del grupo CFB'. The classification is 'especie'. The genetic code is 'Tabla de traducción 11 (Bacterial, Archaeal y Plástido vegetal)'. The lineage is 'organismos celulares ; Las bacterias ; Grupo FCB ; Bacteroidetes / grupo Chlorobi ; Bacteroidetes ; Flavobacteriia ; Flavobacteriales ; Flavobacteriaceae ; Flavobacterium'.

Fuente: Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estado Unidos (2019)  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=459526>

## Anexo 5. Identificación taxonómica de la cepa 5



The screenshot shows the NCBI Taxonomy Browser interface. At the top, there are navigation tabs for Entrez, PubMed, Nucleótido, Proteína, Genoma, and Estructura. A search bar contains the text 'como nombre completo' and a 'bloquear' checkbox. Below the search bar, the taxonomic entry for *Chloracidobacterium thermophilum* is displayed. The entry includes the taxonomic ID (458033), the scientific name, and various strain identifiers (personal, ATCC, JCM). It also lists the rank as 'especie' and provides a genetic code table link. A taxonomic lineage is shown at the bottom, starting from 'organismos celulares' and ending with 'Chloracidobacteria'.

NCBI Taxonomy Browser

Entrez PubMed Nucleótido Proteína Genoma Estructura

Buscar como nombre completo  bloquear ir

Monitor 3 Niveles mediante filtro: ninguna

### Chloracidobacterium thermophilum

ID de taxonomía: 458033 (para referencias en artículos, use NCBI: txid458033)

Nombre científico: *Chloracidobacterium thermophilum* Tank y Bryant 2015

tipo de cepa de *Chloracidobacterium thermophilum* : **personal :: B**

tipo de cepa de *Chloracidobacterium thermophilum* : **ATCC: BAA: 2647**

tipo de cepa de *Chloracidobacterium thermophilum* : **JCM: 30199**

sinónimo homotípico: "*Candidatus Chloracidobacterium thermophilum*" Bryant et al. 2007, nombre del candidato <sup>1)</sup>

Nombre NCBI BLAST <sup>®</sup> : **bacteria**

Rango: **especie**

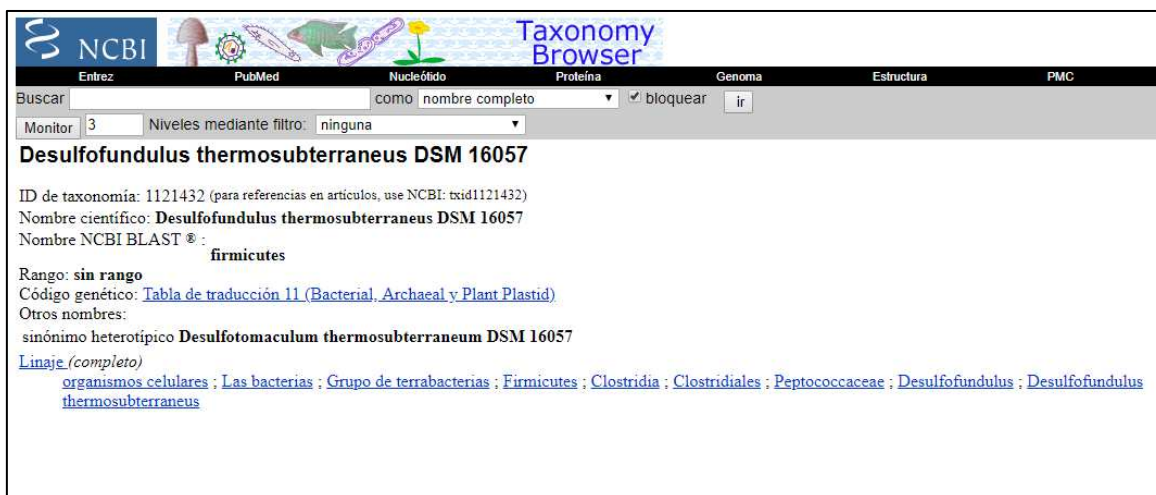
Código genético: [Tabla de traducción 11 \(Bacterial, Archaeal y Plástido vegetal\)](#)

[Linaje \(completo\)](#)

[organismos celulares](#) ; [Las bacterias](#) ; [Acidobacterias](#) ; [Blastocatellia](#) ; [Chloracidobacteria](#)

Fuente: Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estado Unidos (2019)  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=458033&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>

## Anexo 6. Identificación taxonómica de la cepa 6



The screenshot shows the NCBI Taxonomy Browser interface. At the top, there are navigation tabs for Entrez, PubMed, Nucleótido, Proteína, Genoma, Estructura, and PMC. A search bar contains the text 'como nombre completo' and a 'bloquear' checkbox. Below the search bar, the taxonomic entry for *Desulfofundulus thermosubterraneus* DSM 16057 is displayed. The entry includes the taxonomic ID (1121432), the scientific name, and the rank as 'sin rango'. It also provides a genetic code table link and a taxonomic lineage starting from 'organismos celulares' and ending with 'Desulfofundulus thermosubterraneus'.

NCBI Taxonomy Browser

Entrez PubMed Nucleótido Proteína Genoma Estructura PMC

Buscar como nombre completo  bloquear ir

Monitor 3 Niveles mediante filtro: ninguna

### Desulfofundulus thermosubterraneus DSM 16057

ID de taxonomía: 1121432 (para referencias en artículos, use NCBI: txid1121432)

Nombre científico: *Desulfofundulus thermosubterraneus* DSM 16057

Nombre NCBI BLAST <sup>®</sup> : **firmicutes**

Rango: **sin rango**

Código genético: [Tabla de traducción 11 \(Bacterial, Archaeal y Plant Plastid\)](#)

Otros nombres:

sinónimo heterotípico *Desulfotomaculum thermosubterraneum* DSM 16057

[Linaje \(completo\)](#)

[organismos celulares](#) ; [Las bacterias](#) ; [Grupo de terrabacterias](#) ; [Firmicutes](#) ; [Clostridia](#) ; [Clostridiales](#) ; [Peptococcaceae](#) ; [Desulfofundulus](#) ; [Desulfofundulus thermosubterraneus](#)

Fuente: Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estado Unidos (2019)  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1121432>

Anexo 7. Identificación taxonómica de la cepa 7

**Thermothelomyces thermophilus ATCC 42464**

ID de taxonomía: 573729 (para referencias en artículos, use NCBI: txid573729)  
 Nombre científico: **Thermothelomyces thermophilus ATCC 42464**  
 equivalente: *Myceliophthora thermophila* ATCC 42464  
 equivalente: *Sporotrichum thermophile* ATCC 42464  
 equivalente: *Thielavia heterothallica* ATCC 42464  
 NCBI BLAST ® nombre: **ascomicetos**

Rango: **ningún rango**  
 Código genético: [Tabla de conversión 1 \(estándar\)](#)  
 mitocondrial código genético: [Traducción tabla 4 \(Molde mitocondrial; protozooario mitocondrial; coelenterate mitocondrial; Mycoplasma; Espiroplasma\)](#)  
[Linaje \(completo\)](#)  
[organismos celulares](#) ; [Eucariota](#) ; [Opisthokonta](#) ; [hongos](#) ; [Dikarya](#) ; [Ascomycota](#) ; [saccharomyceta](#) ; [Pezizomycotina](#) ; [leotiomyceta](#) ; [sordariomyceta](#) ; [Sordariomycetes](#) ; [Sordariomycetidae](#) ; [Sordariales](#) ; [Chaetomiaceae](#) ; [Thermothelomyces](#) ; [Thermothelomyces thermophilus](#)

Fuente: Centro Nacional de Información Biotecnológica de los Estado Unidos (2019)  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=573729>

Anexo 8. Tabla 2 del Acuerdo Ministerial 097 Criterios de remediación (valores máximos permisibles)

Parámetro	Unidades*	USO DEL SUELO			
		Residencial	Comercial	Industrial	Agrícola
<b>Parámetros Generales</b>					
Conductividad	uS/cm	200	400	400	200
pH	-	6 a 8	6 a 8	6 a 8	6 a 8
Relación de adsorción de Sodio (Índice SAR)	-	5	12	12	5
<b>Parámetros inorgánicos</b>					
Arsénico	mg/kg	12	12	12	12
Sulfuro	mg/kg	-	-	-	500
Bario	mg/kg	500	2000	2000	750
Boro (soluble en agua caliente)	mg/kg	-	-	-	2
Cadmio	mg/kg	4	10	10	2
Cobalto	mg/kg	50	300	300	40
<b>Cobre</b>	<b>mg/kg</b>	<b>63</b>	<b>91</b>	<b>91</b>	<b>63</b>
Cromo Total	mg/kg	0.4	0.7	0.7	0.5
Cromo VI	mg/kg	0.4	1.4	1.4	0.4
Cianuro	mg/kg	0.9	8	8	0.9
Estaño	mg/kg	50	300	300	5
Fluoruros	mg/kg	400	2000	2000	200
Mercurio	mg/kg	1	10	10	0.8
Molibdeno	mg/kg	5	40	40	5
Níquel	mg/kg	100	100	50	50
Plomo	mg/kg	140	150	150	60
Selenio	mg/kg	5	10	10	2
Talio	mg/kg	1	1	1	1
Vanadio	mg/kg	130	130	130	130
Zinc	mg/kg	200	380	360	200
<b>Parámetros orgánicos</b>					
Aceites y grasas	mg/kg	500	<2500	<4000	<4000
Benceno	mg/kg	0.08	5	5	0.03
Etilbenceno	mg/kg	0.1	20	20	0.1
Estireno	mg/kg	5	50	50	0.1
Tolueno	mg/kg	0.37	0.8	0.8	0.08
Xileno	mg/kg	2.4	11	20	0.1
PCBs	mg/kg	1.3	33	33	0.5

Fuente: Acuerdo Ministerial 97

Anexo 9. ADN secuenciado de la cepa 1

CCCAAAAAATAATACTCTCTTCCTTCAACCAGCCCATTCTCTCTCAATCC  
TCCTCTGCTGCGCAATTTGTTTTGTAAATCACTCAGCTCCTACCATTTCTCAT  
CCTTCATATAGATACATAACCAGGCCGAGGTAATGTCCCTCCCTCACACATGT  
CATATCTTACTCCCTCTGTATTCTGTATGTGTCATCCTCGCTGACTGACCAGA  
CCTTCCCCTGTCTTTGTTTCGCCTTACCTGTCGTCACTCACTCACTACTCGTCT  
GTGATCGTACGCTCGTTTGCTCAAGCACACGTCCTTACCACCTTCAACTTAC  
ATCGATCATCCCCGATGGCAACACCTACCCCTCCGCGTCTCTGCCCTCAACT  
CTTAGCTCGACACTCCCTCCTTTTCTATATTCTCTCGTCCACCATTTCCCAT  
ACTTGCTCGATACCGTACATCACTGCTCAGGTTTCTAATCTACCTCCGCTCAT  
GAGCGGCCCTACCCGATATACAGTAGTTATTCTTATTCAACCGTGCTTTTTG  
TCTCCATCCCCTTCTATATGACTCGTCTCCGTGATCCCAAACTTTCGCCTTAT  
ATCACTGCTTCACTCCACTGACTTTCTACTCACTGTCTCTTCTTACTCCTGTA  
TATGCATACTTCCCTCTCAGTCGAGCAATTCGCCATTCTTACCATAGGTCGA  
CCCTTATTCTCACTCCGGTCGAACTCTTAATCATCGTCAATCCTTGGCATAGC  
CTATAGCTTGTTCCGATCCGTTATCCAGATGGTAATTGCTTAACTCCCTGCTT  
TCAATCCCTAGGCTATTTCCCCGTAGGCCTCTATACAATGCCCTCTAGCTCTT  
AAACGCTGCACCCCACATCCTCTTGTCCCCTCTTTTGCATCTGCCATCTACCT  
ACTTCCAGACGTGTCTAATCGTCGGATTGCTAGATCTATTCTCTGATTCCCCC  
ACTCCAGTCTAGAACTCGAAAACCTCCCTCGCCAGAACTCTGTTTCTACTT  
GAGTGTATATGTATCTAGTGCAGCCTCTTTCTCCCTGACCCCTTTCCTCATCA  
GAGATGCACTTTAGAAATGTTTCGATTTCGCTTCTCCTAATCGTCTGGATTCCG  
TTGGGGATTGTCCCTAGTTCCTTCCATACCACACGGTGTTTATCTACTGTTTA  
TCCACGAATTTCTAATGTGCTCGTCGTCCGTCGACTCCCCGCACATCCTTA  
CCTCAATTGCTACTGTCCTGCTTCGTCAGCACGATCCCGTTAGCTTCGTGTAC  
CCCCTGTAACCTTCCCTAACGTCACCTCCTCAACGACTCCCCATCTAGTACTC  
GTCCCCTACACCCTTCTCTTATCATTTTTTTTTTTCCCTCAACATTTACTACGGC  
GGCACAGATACTACTACCTAACACCCCATCTGAACTCCTCCCTCCACCCTTT  
TTTGAATAGAATAATAATTTCTACATGGTAAATAAATGTTCTATCTCCGCC  
CCCTGCGAATAAACTTTTACTCCCCACAAATCCTCCGCACCCGCTTTGATGT  
GCCGTACGAGTTTGCTGGTAACTAAGGGATCCACTCCTTAGGACCTATACGC  
AATTAACGAGGAATTCTTCATTTTGTAGTATATTAATGCGTCCCACTAATAT  
AGTTATCATTATAGAACCGTGTCTCCTGCCCCCGATACGGCTATCTTCCCTTC

CTTCTATATATTACAAGAGCTCTCCCACCCATTTGAAGAACCTACTCATTTTC  
TATCTACTGTTTATGTAATCCCACACCACTACTTCAAATTTGT

Anexo 10. ADN secuenciado de la cepa 2

CCCTAGTAACCTTTAGAAACCTAATATTCAGCTTCCTTCCAGTCCACACACC  
CCCCTAGTAATCTCCACTCCATACCTTGTATTAGTGTGGCTTCTCAGCCTCG  
GACGACTATCACACATATCGTCGCTCATACTCTGTCAGTATTAGTATACATA  
TGCATACACTCGTCCAGAACGTCTAACAGCTATCAACATACCACCTCAACCT  
TGCACCGTGCTCTCATCGGTTTCATCTTGCCTTGCCTCGAGACCATACACATT  
AGCTCACCGTACTCATCGTACGATCGGCATCTGTTGCCATCCCCTAGTACC  
TGAGTCGATCTCCTTACTGGTCATTGCAAGCCTACAGATGACATCTCATATG  
CCGACTCATGAAGGTCTAGCTGGTATACTCTCTACTCTCATTCGCTCTCTACC  
TATCCGCTTCAGTCTGCGACGCTGCATGTACACGCACAGAGCGAGTCCAAG  
CGACACCGCACGTACGACGCTTCCTGTATCTAAGCGTCTAGCTACCCGATAG  
CCCTTCAGCTGACAAATTGCAAGTCACGTGATGCACGCGGTGTAGCCCAAC  
TCTCGCTCCACGCTACGTCAGATTTCCGACTATGCTACTCAGGTGTATGCTG  
CCGTGTAACATGATCACAGAGCAGCACACTTTGATCATCCTGCCATCTACCC  
GTTTACGCTACTGCTAGTCAGTCAACGTCAGCTCATGCCACCTGCTGCGACG  
AATCGTTAGTACGTAGTACACTTCCAACCTCGCTTGTCCCTCGGAATGCAGTA  
TGCGCTCCTCGTCTCCACTGTGTGCCAGTGAATCGAGCTTGCATAGCTGAAC  
TCATTACTCCATCTAATCGTTATCTCCTCCATGCCCCCTCTCTGTACTCCCACC  
GACAGCGTACCCAAGACTATCTCAATAATCAACACTTATACGGCCCTGTTTA  
TTTTCAATTGCGCTTTTCATGCTGTGAAACGTATTCTTCCCCTTACCCCGTGC  
CCAACACTCTTGTGCATCATATTTTACATACCTCGTGTACCGTGCCCGCAAACC  
GCTTGCGCCCCCGGTTCATCCCCCTTCCTTATCCGGTTCGATTCTTTCGTTTTG  
TTGAATCCAATAGGTATTACGACATATAACCACGGGCCTGCCATGCGTTTAGT  
ATGCTACCTTGTCCCTGTGCAAATCCCCTAATACTCTAAATCCTAGTCACT  
CCGTCCGCACGATCTTCGCTGCATTTCTCTATACACAATCAGCATGGTCTA  
TATACTGCACTGGCAAGTGACCCGTTTTGTTCCCTACCCCTATCCCTGACCCTT  
CACCTCCAAACCCCAATACCCCTATTTATTTTTTGGAAAGAAATCTTGCATTA  
TCCCTCCCTTCCCCCTGGCTCCCATCCGTCTAGCAGTACACCGGATCCTATG  
GATCATTCCCTCTCATCGAAGATTCCGTTGTATTTCCCTTATTTACCTCACA  
TCTCAGATTGTTCTAATATTTAACCCCGTATCTCGGAAATCTACTCCCCGCC  
ATGTCTCACTCTTTATTCCTCTCTCACATTAAGATGAGGCCTCCAGTTCT

CTGCCATGTTTCACTGAGCCCCTTCATAAATCTTATTTCCCTCATATACCCAC  
CCCCGTTTTGTGACAACCCCCCTCCACCCGCTATCTGGAGGTTTTTTTTCTC  
TCATAGCTTATCCTCCCGCGACCTTTAGAAATCTTTTCACCGCATTCCATCTA  
TATCTCTTCTACTATCCCTTTCTTGAAATTAAACTATCCCCCACCTGAAAGA  
CGAACTGCTGATCCCCACCCCGAGTGATGATGTTTTTTCTTCTTATTCCCC  
CCCCTTTCCTCTAGCCATCGCTATTGTGACTTAGTAAAACGCTCCCCTTGTCT  
TACGCACGCCTTTTAAACCCACCCTGTTACAATAATTTTTCTCTCCCATATT  
CTCTTCTTATTTATTTAACTATCCGCTGATTGCGACTTCTCCTCTTTAATTTTT  
TTGGCTCTTCGACACTTTGGTGTACCCCCAGTTTTATTTCTCTTATATTTTC  
TCCCCGCCCCATTAGCATAAC

Anexo 11. ADN secuenciado de la cepa 3

GAAGGAGCGAAAAATTCGTGCAAGACCTTAGAAGCGTTCGAGATGTTTG  
TTTCATCGCCGCGGTATTAGAAGTAATTTAAGGAATTGAAGCAAGGAGGAG  
AGCGTTGTTTTATAGTTGTTGACATGTATGGACCGGTCAGTTTCAAATGTCG  
GCTTTCATGACTGCGGGGTGACAAGGGGTAAAGGATGAAGGTATTATGCTT  
GGTAAGGTAAGAAATTCAGTTCATGTAGAGGATGGTGGGGATGGAGGAAG  
GTGCATGGCTTATACTCTGGCATAGAGTGGATACCGCGTTATTTATGGTTGG  
TATGTAGGTTGTGTTGTATGGAGAGAAAGTGATAATGGGGAGAGAGAATGA  
ATGTGCTGATGGGGCCATCAGTTG

Anexo 12. ADN secuenciado de la cepa 4

CCAGAATCCAAAACCTACAAACAACAAAAAACAATTAACCCACCAACCC  
CCCCCCCCCCCCCTCCCGAACCAACTCTCTAACTGTATCGTCTTCTACTC  
CCTCTCCTTCATTCTCCATATATTTATTATTTTTTATATTTTTATCACTTCCTT  
CAGTCACCCCCCCCCCCCCACCCCCACCCACCACAGAGACGAACCACGGAC  
CGGAGCGCCACTCCGTGATTTGCAACTCTTACCCGGCAGCCCTCTGATGTAA  
GCAACGCTTCGTCCTCTTTATTGATAACCCGCCCCCCCCCTTAATACCAGAAC  
TCCAGTGCTACATCGTCCACTGTCAGAGCCCACCCACAATCTCAGATCGTG  
ACTGTGCTACCTACGGTTTATTCTCTCGGTCACTAGCTCCTGCTCTCCGTAC  
AGTAAGCGATACTGTGTGACTGATCGAGCTTTAGCCTTATGCTGTTTCGCACC  
ATCCTCCGCAGCTCGTTGATAACCGCGATAACTGACTTCATTTTACCCTCCGC  
GCGCTCTGTCAGCTTACCTCCATCCAGGAAGTTATGGAAGCATAACATGTACA  
CCGAGTACGCTTTGACAACCTTACTTGCATTCCCTGTACAGCATTACGTATA  
CGACCCATCATCCTCCCCCTCGCCAATTGTACTCTTATCGCAGCATCGAT

CTCAGGAACGCGTGATTCCGACATCTCTATCTCCACAGTCTTATCCTTGTGC  
TTTATACTCCATGGTTTACCTAGTAATCTTTTCTTAGATAGTACCGTGTTT  
CACCTTCTCTGCTTTCCTTAAAGACGTGCGCTAAAAGGTCCACCTCGCTAAT  
CACGCAGACACTCTCGAATCATCTATCTAGTTTAAATAGCTTCGCAATCCCA  
TTGAGCTAAGTAAATTTTCAGCGCTAACCGCCTTTTACCTCCTATCTTGCTGC  
GTGAACCTCGCCCTCAAATACTTAGCTTTTAACTTAACTACCTTTACCAAG  
TCTTCTTGGCCCCTTACCACCTATCCCCATAAACCTAAAGCAGAACCGAAC  
TGTACCGGCTTCTCAGCCCCGTTAGACTGAACATTCCTAATCTTTCCCTGT  
CCTAATTCCTCTTAAATTCTGTATCCCCTGGTTTTACAAGTCCCGCTTTCGC  
GCTTCTCCTCCTATCCCCCGTATCCAAATGGGATAAACTTTCCGCGTGTGT  
GTGTTGACTTTTGTGATTCCGATGGGTGAAATCTCCCGTAATACCATGCTAA  
AACTTCGAATTGTACAGGACCTCCCTCCAACCACTCTTCTCCCCGCCCTCCA  
GTGCTCCCTGAGAGTTTAAATCTCCCGCCCGGGTCTCATGCCCAACCAGAATC  
ATAGCTACTCTTGTCTCTTAACTTAGCACATCACGACATATAAATAGATAC  
TATGTGACTTTTGTGTGGCTGCTCTATTCGCCTTGGCTTTACTCGCTGACTCG  
GCGACGCCCTGTGTTATCATAAATACTCTCCCTCTTTTATGACTGCTTATTGA  
AATAACCACCCATGAATTTTTTGTGCTTTTACTAGTATACACCGACCGATGA  
GATTAGTTTAGCACCAACACGGTTTCTTTTCGTAATATTCCCTCGCCATTAA  
GCAAGGATGACCTCGCCTCTTCTGCTATCTTCTTCTTTTCGCCACTCTAAGTA  
ATTTGTTTGCCTTTAGCTC

Anexo 13. ADN secuenciado de la cepa 5

CCGGTATCCAGAAACCTCCCAAACCACACATAAACATCCAACCAACCAAAC  
CCCCCCCCCCCCCCCCCGCCAGCACGCATATTTAATGTATTACACCTACCT  
ACCCTCCTTCCATCTGTATCACCTCCTCCTCCATCAATGCTTATTTATTCTGT  
ATTGTTGAGTACTCATGTATCTACCCTCCTCAACCCCCCGCCCCCCCCCCCC  
CTCCCGCTCCAGCCAGCACACTGAGTTGCACACTACTTCGTAGTCTATTG  
ACACGCGCACATCGCCCCTTCACTCCTCTGGGACACAACCATAACAAGCGAC  
GAGATCCCAGCCCTACATCGTCTCTTAACTCACACCCCATAGCCTCATACT  
CGCAGACACTCTCAGCTCGTGCAGTGATCTCGACCTAGTTCTCCCGATCCAG  
TTCTAAGGAAAATCTGCTATCGATCTACAGATACTCTATTGCTCTCACCGAA  
TAACATGCTTTTCATCCCTGTATTATAGAGTAGAACTAGCTGCGCCGGGACG  
GCTCTTCATCACCTTCCCGGAGCTAGTCCCACCTCATAGCCGCTCAATAACA  
CATACTATATGTTTTTGTAGCTTTTTAGTTTTCCACATCTTATTTTTCGCCGCC

ACTCATGTCACGGATAGTCATATTAACACAAGTAATTTTATTATTAGCTGCG  
ACTCTGAGTCAGTCCTTCTACCTTGGTACATTTAGCTATTCGATTCAGTATGG  
TATCAAGGTGATCTCATTGCACAGCATCTCACTGAGCGATAGTCGCACACTT  
TATATTGCACGGATTTCTTAAGCTATCGAAGCGCGTGTGCACGAGATTTGCT  
GGCACCTTTACGTA CT CGGCACATGCCTTACTAGCATCATGTCCACTAGGTA  
TTACCGTACTCGTTATGCTGTCCTTTCTCGAGTCAGATTATTATACTGTGTCT  
TGATATGCGCCTGTAGTTCTATCGGTTACATGACGCAGACGTAAACTCAGCT  
ATAGTGGACTTGACCATCCACTTGGTCTCTACCCACTGACATCAACTAGATC  
CGTACTACTTTCACTTAATGTTACCATGTCTGCCGAAATACGCACGTCCTAT  
TCCTGCCGCTTTTCGCAGTTATGTGCCATAACCATACTGCCCGCCAGCCGAT  
ATACATGTGTACGCCGATAGCCAAACCCAAACGTTTCGTTAGAGCAATCGC  
CTCATATACTACTCACACCATATTAAGCGCTCACTATGAATCAGAAGAATGC  
CATGGCTGCCTAGTTTTCACTACACAGTATTCCATCTTCCCCCTCTTCTCTTC  
TCCGTTAACGATTTTAATATTCTGACCCCAAATATCGTAAGTCTCCGTTCC  
CCTGCATGCCCCCTATTGCCGATCTAATCCCCTGTGTACTGGAACCGGTACT  
TCCATTCCCTTCTTGTGGCTGGGTTGCTAACTTCTTTGAACGACCTCTGAAAC  
ACTATATTAGTTACTGTGACACCCCCCTGGTGACCTTTCTGCCTCCCATGTTC  
AGCTTCCCTGAGTTATTCCCCACCCCTGCACTGATTATCCCGCAACCAGCGA  
ATGACCGCCGTCGCACTCTCGACTTCCGCTTTC AATCACTAATGAATAATAA  
CCGAGAAACATTACTTGCATAAAACAGCTCTATTGCGGAGATCCTCTTTTCGT  
TACAACAGTGCATTTCCCGGATGCGACGATCCTATCCCCTTCCGAGAGTCCA  
CTGCATACGATTACATACCCCTGTTAGTATGTATTTATTTGGTGCTCTTTTCGC  
CCTTGCGATAATGTATCCTTCGCTCCGCTACGCATCCCTCAGTAGTACGGTT  
CTCCCCTCCGTATAACGTTGATGATCCGCTACTCCTTATGTGCACCTCTGCTA  
ATATATTGTGCTGTTCAATGCTTTGCCTACTTTTTACATC

Anexo 14. ADN secuenciado de la cepa 6

CCGGATCCAATACTAAACACATACAAAACAAAATTC AAGGAAACCACCAA  
CCCCCCCCCCCCGCCCCCTTACGTAATGGCTAACGAACTATCTTCTCTAT  
AACTCTGTCTCCGTCTATTCATCTTTTATGTGTCGTATGTTGGAGTAGTGCCT  
ACCTTTCTCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCGCGCCGCCGCGACCC  
AAGCCGACGCGCGCGGAGCACGCCAGGCACACAACGCACACGGGGAGC  
AACAAACGGCAGCAGACCGCAGCCAGACAAGCTATACGCAGAATGCAACAG  
CATGTTCGTACAGAGCGCAGGGAAACGCCGTCGACGCCGAGCGCTCGGACAGC

TCGCTATACTACTTGATGCCCTCGTCATACGTAGTCTATCATGGAGCAGTCT  
ACCTCCTATCTCGATCGGCCACTGCACGTGCGATCATTGAGACTGCATGACG  
ACCATGCTACGAACATCTGCGAGTCTCTAACTCCTAGCAGACTCTGATGCTA  
AGATGTGCTCGTTTAAGTGTGCTATAGCAAGAGCTGAACATATGAGTGCTA  
GTAGTGCGTACGCTCCGACCATGCGCTGCGTACGATTCCCTTCCTATGTCTTA  
CAGCCTTCCGTAGCTCGACCACTGCGACTGATACGTATTCATCAGCTATGCG  
TCATCCTCAGTGATAGCATGCGCCTCACAGTTCTCAGTCGTATGCTGACGTA  
TTGTCAGGTCGTATACGACTCGATGCTATCTCTTCTGCACGTGACTCTGCCT  
CAACCTTACACACACGTCAGCCTCTCGGCTCCACTCGCTGCATTCGTAGATA  
TACTCAGTCGATCGAGCTGTCGTCATCGGCCATGGTACAGGAGTCTTCCGTG  
CGTCCTCATCATGCTCGGCTGATGCCAGTATGCGCTTGACATCTCCAGTGTC  
TACGTCTGCTTATGTATGCGTATCAGAATAGTAGAGTCGTGATGCTGAGTAT  
CAGAGCTTAGTAACATCTTATGACATCGCTGATGCGAGCTGATGAATGTGC  
AGCTCTTATGCTGGTATCATCTGTCTTCATATATCTGCCCGATCAAGGGTGT  
CAACGATCACATACCATGCAAGTGGTACGAGTGACTCTCATCTCGCTTCTCA  
TTATGCGCACCTCTCGATACTTGACCCTCACAGTCGTAGCATTCTTGAGATG  
AAATATATGTTGTGTACTATCAGTAGATGCGAGATCGCAGCTATGCCGTGTG  
TCGAATATACATCCTCATGTGACCTTGACAGTACTACTGTGCTGCTACGCAC  
GCTACAGACTCTCCTATGTGCGAGCTACTGCATAGACTTCACAGTGCTATCTA  
GAGATCGCGTCTTACACGATCACGTACTIONCACAGCTTATGTATAATCTGATCT  
GGTATCTGCAGCACACACGCGAATCTCGCTGTGGATAGCGGTTTCCTACGCG  
GATGCAGGTCTATGACCTATAGTTAGCTATTCGTTGCATCTCGTATAGTGAT  
ACCAGCACGCTTTACGTGCTTACTGTGCTACGGCGACGATATTACCGAAAG  
CTAGGTACGACTCACGCTGATAATGTCTATTCCGTACCGACGCTGAAGTCGA  
TGTATGTGATGATGTATAGTCTGCTGACGCATGACTCACTGAGCTTGGACTA  
TCTCTGTAGAATCATCTGGCGTCGATGCACTGTCATGATACTCGACTGCAAC  
GTCTACACGACACCAGTCTCCTGATAACCGACGATGCGTCCATGCTATACTCA  
TCACGCTCTACGCTCTACCGCACATACGGCACGGTATAGTATTATGTAGCTG  
TTGACGCTTGAGTGCTGTCTACTGGACATATCATCGACATATACTGCTGATA  
CGATGACTACTCGCACGCTACACTACGTCTATCATTGACCGTTTCGTGCCGCA  
CGTAGAGAACTGATGCTGAGCTACGACATGCAGCGAAGACATGACACGCTA  
TAATCGCTCAGTACTCGCGAGTCATAGCGGCCTGCGTGCAGAGACATCGAT  
ACTTCGTATAGCATTTCATATACTACGCTGATGTACCTGCTTTCAGCTGAGCA  
ACTAACACCAGTATGCAACCGCTACTGATGCTGTTATATAGAGCTTCGCATC

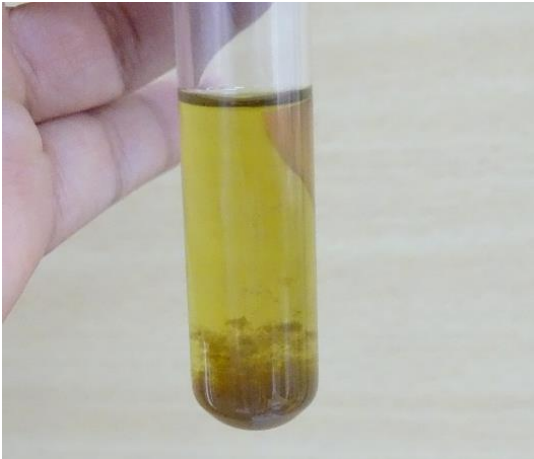
ACTCTCACGATATGAGCGACACACGTAGAGTGTACTTCTACGCATCACACA  
CGCTACCCGCACTACGCTACTGTACTCGCCGCGTGTTTATACGTTTCGTACTA  
TACTTGACGCGCTAGTTTATATAGATATGTCTGAAGACTACGCGCTACGACCA  
GATAGGTGACTATCGGTGCTTGCCCGCTAGTCGCATATAGATATGTGTTATC  
GTACGCGTGATACTACTTGTGAACTGCACATGCGTCCTCTACACGCCAACGC  
TATCTGAGTTCAGCCATCACACATGACTTTCGCTACGTGCACGAGTAATGAG  
TGAATCTATGCTACACTCTATCTCACGCACTACCCACGCGCTTGACGTAG  
CATTTTTGTGAGTTCAGTCTATCCTGTACATCTTACTACAACCTGAGAGTGAT  
TGATCCTCTACGACGACAGTGTGAGCGCTCGAGCAGATATCTATGTCGCTCG  
TATGACGCAGCGATACATCGTCAGATACAGTCATATGTATAGCATAACATCTA  
GCTGCATGTTACACATCACCGATAGAGCTCTATGCATTAGACTCACAAGAAT  
CGCATTATTCGCACTGCGTCCGTCGCTCAGTCATAGATAGATATCTGTATAC  
GCTTTGACTCTTAGTGACGAGCCCGTTCCCTACTCATGACACTGCGTCAACTA  
TGTCATCCTACATCACTATCCTCGACTCACATGTCACTATCGCACTGCACTG  
ATCATACGCACTCTACACTTATCGACTCAGACATGAGTCCGTGTGGTATGTG  
ACATCTCATGTCTGTAATAGATGATGTCCACTGTCTTTCTATCAGCTCAGCG  
ATCGTCGATAGCACAGAGCACTCACAGGAGGCAATGTATAAATTATCGTCA  
TCTCTGACTGTATTTGATATATAGAAGATTAGTGTATCACGCACGTCTGGTA  
TCGACACTGAGAGACGATGAGACGCATACGATCGTCGTGACCTGCGCGTGT  
CTACACTTTATCATAGTGTATAGATCAGTAATCGTGCTGCCTATCGCACTC  
GCTCACGTCTGCCATAGATGATAGTAGTCAAATATCGTGCATAGACGTAT  
ACTGAGCGCCGAGTCGTGCGATAGCGAGCAGCAGAGCTCAGCTAACGCCT  
GGTCGTCTAGTGCTGCTGACGGCAGACATGCAGAAACTAAGTTGATGTGCT  
CCCGTCATCATTAGAGGTCA

Anexo 15. ADN secuenciado de la cepa 7

CCCCGTAATCCCCACCCTCCTACAATACATGAAGAACATCACAAACCCACC  
AACACCCCCCAACAAAAAAAAAAAAAAAAACAAAAAAAAAAACCCAAAACCTT  
CCTCTCCCCCTTCTCCCTCCATCTATCTATAATTAATAATTACTTTAAT  
TTTTTAACACTCATCTCCCCACCCCCACCCACCCCCCTTCACGCTGACCG  
ATCTGTTACCCGCATCATGAGTGATATTGCTCCACTCTCTCGCACTCCTGGTT  
CGCAAGCACCTCACGCAACCATCCACTTGGATCGAGTACGTCCGTACCTCAC  
TGCTATCCGCAGTCAGACGCGCAGACACATGCGGGGTACCATACTTAGGGG  
CACTTAATGCCGGTATCCATCTGTAGTTTACATGTCAACAGAGGGTATGCCT

GCCACTCTCTGGGTAGAACTGAACTCAATGAGTCACGAACACCGGATATCT  
GCAGTCGAGTCTCTATCGTCCTGTGGGTCGGCATATATGTCTCTAGCGCCCG  
CTAGTCGCAGCCAGCAACGTTAATTTTCACATGTGCAGGTCTGACGACCGAC  
GTAAACTGAAAGTAGGATATCCTTAGACAACCTTCAAAGTCGTGTGATTAC  
TGCCGTATAACAGTACACGTCATGCTCACAGCCCATATCGCAGAACCGTCTA  
ACGGTCGACGGCGATCAAACGAGGCACCGATGTGCATATTCTCCAGTAACT  
CCCCATGCCTTGATAATTCGTAAGCTATTCTGACATAACCGCTCCACATACC  
GTCAAAAACATGTTCCCTCTCTACGCCAGCTCACCTGAATCCCGATGTTAC  
GACCTACGCTAAACTTTGTGATATCCACATAAGTTAGTAGTACCTATGGATA  
GGAGGTGATTTACGTATACTAGGTATTCGTCAGCAGAGTGAAGACAGTGAG  
ACTTTACGAAGTCATCCACATTCGCGTTAGAAACAACGCTCCAGAGTATTG  
TCTTTTGTGCGGATTCGATTCGATGTGATGGTCCAGTGTATACATCAGCTTTT  
GTGCGAATCACCTTAATTAGCCAACTCAACTGTCTCAACTTCGTGGTCCGGTC  
AACCGAAGGATTTGCTACCTTTACGGTAGTCCCTAGTGCGGGTTGACTCAAT  
ATAAGTTGCCGTGTTTATACGTTGTGACTATGCTCTTAACAATACATACCTG  
ATTTATCGCAAATATGTAATGAGGTCCACCATGTGCAGTGCCTTGGTACCTT  
GTCTCCTCATCTATGACTGTTTCAAACCTGACTCTCAAATGGCACCCTCACT  
CTACGCAATCGCTCACTCATCAACCTACTCTGCGCGTCCGCATATGCTATTT  
ACACAAGTAATACGCATAATCGGTGACCTAGTTGCAATCGAATACCCAGAT  
CTTAGAGCGAGTGCGTACCGATAACCGAAGATATGAAGATGAGGGACCAGC  
ATACTGGCTAAGTTTCATGGGTGGCATCTCACTAGTTGATATGGTTGATACG  
TCCGTGAACCGCTTCGCCGTCGATTATAATGTGTTCTTCTGTGAGAATGATC  
CTCTGTTGCATCAATATTCCAGGGAGTAGAACTGCATCGTCTACGTAGTGGT  
CTGATACAGCCCATAATGTTCAAGTAAAGCAGTTATCTTCGTAGTATCCAGT  
TATCTCGCGTCGACGAAGGTGATTGATCCGTACGCTCATAGCACACTGGAGT  
CGTATTCGGTGCCATCATGAGCCTCTCCCGTGATGGAAAC

Anexo 16. Bacterias en proceso de lixiviación de cobre



Anexo 17. Trabajo de laboratorio, caracterización exsitu



Anexo 18. Muestreo y caracterización insitu



Anexo 19. Transformaciones estadísticas para el crecimiento celular a las 24 horas

Cepa	Dato original	$\sqrt{x}$	$\sqrt{x+1}$	$\sqrt{x+1/2}$	$\sqrt{x-1}$	$\sqrt{x-1/2}$	$\log_{10} x$	Arcsen $x$
C1	0,0410	0,2025	1,0203	0,7355	n. d.	n. d.	-1,3872	2,34
C2	0,1093	0,3306	1,0532	0,7806	n. d.	n. d.	-0,9614	3,27
C3	0,0330	0,1817	1,0164	0,7301	n. d.	n. d.	-1,4815	1,89
C4	0,0476	0,2182	1,0235	0,7400	n. d.	n. d.	-1,3224	2,72
C5	0,0457	0,2138	1,0226	0,7387	n. d.	n. d.	-1,3401	2,62
C6	0,0457	0,2138	1,0226	0,7387	n. d.	n. d.	-1,3401	2,62
C7	0,0333	0,1825	1,0165	0,7303	n. d.	n. d.	-1,4776	1,90
Valor P	<0,0001	0,0053	0,0013	0,0014	n. d.	n. d.	0,0230	<b>0,5064</b>

Anexo 20. Transformaciones estadísticas para el crecimiento celular a las 48 horas

Cepa	Dato original	$\sqrt{x}$	$\sqrt{x+1}$	$\sqrt{x+1/2}$	$\sqrt{x-1}$	$\sqrt{x-1/2}$	$\log_{10} x$	Arcsen $x$
C1	0,0467	0,2161	1,0231	0,7394	n. d.	n. d.	-1,3307	2,6700
C2	0,2136	0,4622	1,1016	0,8447	n. d.	n. d.	-0,6704	7,4800
C3	0,0603	0,2456	1,0297	0,7485	n. d.	n. d.	-1,2197	3,4500
C4	0,0463	0,2152	1,0229	0,7391	n. d.	n. d.	-1,3344	2,6500
C5	0,0777	0,2787	1,0381	0,7601	n. d.	n. d.	-1,1096	4,4500
C6	0,0747	0,2733	1,0367	0,7581	n. d.	n. d.	-1,1267	4,2800
C7	0,0553	0,2352	1,0273	0,7452	n. d.	n. d.	-1,2573	3,1700
Valor P	<0,0001	0,0052	0,0010	0,0011	n. d.	n. d.	0,0329	<b>0,0504</b>

Anexo 21. Transformaciones estadísticas para el crecimiento celular a las 72 horas

Cepa	Dato original	$\sqrt{x}$	$\sqrt{x+1}$	$\sqrt{x+1/2}$	$\sqrt{x-1}$	$\sqrt{x-1/2}$	$\log_{10} x$	Arcsen $x$
C1	0,0249	0,1578	1,0124	0,7245	n. d.	n. d.	-1,6038	1,4200
C2	0,1192	0,3453	1,0579	0,7869	n. d.	n. d.	-0,9237	4,8200
C3	0,0256	0,1600	1,0127	0,7250	n. d.	n. d.	-1,5918	1,4400
C4	0,0387	0,1967	1,0192	0,7340	n. d.	n. d.	-1,4123	2,2100
C5	0,0416	0,2040	1,0206	0,7359	n. d.	n. d.	-1,3809	2,3800
C6	0,0217	0,1473	1,0108	0,7223	n. d.	n. d.	-1,6635	1,2400
C7	0,0458	0,2140	1,0226	0,7388	n. d.	n. d.	-1,3391	2,6200
Valor P	<0,0001	0,0286	0,0040	0,0044	n. d.	n. d.	<b>0,1670</b>	<b>0,0598</b>

Anexo 22. Carta de aceptación para la ponencia en el IV Congreso Internacional de Medio Ambiente y Desarrollo



**IV EDICION CONGRESO INTERNACIONAL DE MEDIO  
AMBIENTE Y DESARROLLO**

*"Ingeniería ambiental, avances y desafíos de la conservación y la  
sostenibilidad en el Ecuador"*

**Del 3 al 5 de abril del 2019**

**Cuenca – Ecuador**

ECU-CON-1272

Quito, 20 de marzo del 2019

**CARTA DE ACEPTACIÓN**

**Cesar Arcos  
Santiago Mafla  
Moraima Mera**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DEL ECUADOR SEDE IBARRA**

Es un placer para el Comité Científico y el Comité Organizador del **IV EDICION CONGRESO INTERNACIONAL DE MEDIO AMBIENTE Y DESARROLLO "Ingeniería ambiental, avances y desafíos de la conservación y la sostenibilidad en el Ecuador"**, confirmar la **"APROBACIÓN"**, del trabajo titulado **"Aislamiento de consorcio bacteriano de la fuente termal de pucará, perteneciente al cantón Urcuquí – Imbabura para la lixiviación de cobre."** para su presentación como ponencia en el referido evento, mismo que tendrá lugar en el teatro del Honorable Consejo Provincial del Azuay el día jueves 4 de abril del 2019 desde las 17:00 hasta las 17:20

Saludos cordiales  
Ing. Javier Mullo Sosa  
Comité Organizador  
Teléfono: (593) 987316739  
E-mail: [info@ecuadorconventions.com](mailto:info@ecuadorconventions.com)  
Website: [www.ecuadorconventions.com](http://www.ecuadorconventions.com)



CUENCA  
ECUADOR



0960282670  
032800382



[info@ecuadorconventions.com](mailto:info@ecuadorconventions.com)  
[www.ecuadorconventions.com](http://www.ecuadorconventions.com)



Anexo 23. Agenda para el 4 de abril de 2019 del Evento



15:30 – 15:50	Evaluación de ph en área afectada por incendio del cerro Atacazo con fines de restauración <b>Mirían del Carmen Fernández</b> <b>Henry Daniel Lala Ayo</b>
15:50 – 16:10	Revisión de las variables económicas en la dimensión socioecológicas vinculadas al ecosistema de manglar. <b>Henry Mendoza Avilés</b> <b>Angela Loor Bruno</b> <b>Rodrigo Carrión</b>
16:10 – 16:30	Estrategia de manejo de la fertilidad del suelo de Imbabura desde el punto de vista de la conservación medio ambiental. <b>Kentaro Tomita PhD.</b>
16:30 – 17:00	<b>Conferencia Magistral</b> Programa integral amazónico de conservación de bosques y producción sostenible <b>Msc. Juan Carlos González</b>
17:00 – 17:20	Aislamiento de consorcio bacteriano de la fuente termal de pucará, perteneciente al cantón Urcuquí – Imbabura para la lixiviación de cobre. <b>Cesar Arcos</b>
17:20 – 17:40	Determinación de los contaminantes producto de la combustión por fuentes móviles a gasolina en el cantón Pujilí (Empresa pública de movilidad de la Mancomunidad de Cotopaxi) <b>Ing. Oscar René Daza</b> <b>Msc. Manuel Patricio Clavijo</b>
17:40 – 18:00	Resiliencia en la gestión de riesgos antrópicos debido a contaminantes emergentes: Un desafío a la sostenibilidad ambiental <b>Ing. Mónica Delgado</b>

**5 DE ABRIL**

Hora	Actividad
09:00 – 10:00	<b>Conferencia Magistral</b> Impactos de megaproyectos de infraestructura y propuesta de compensación ambiental por pérdida de ecosistemas naturales <b>Msc. Juan Carlos González</b>
10:00 – 10:20	Caracterización de los viveros de Pelileo, Tungurahua, Ecuador <b>PhD. Aixa Rivero</b>



QUENCA  
ECUADOR



0960282670  
032800382

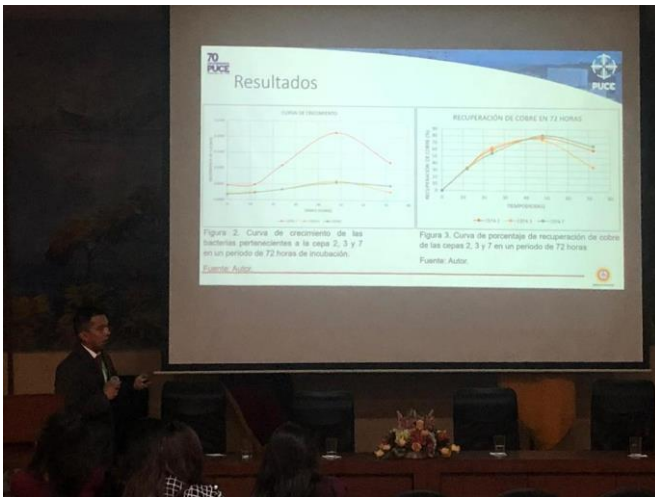


info@ecuadorconventions.com  
www.ecuadorconventions.com

Anexo 24. Socialización de la metodología realizada en la investigación.



Anexo 25. Socialización de los resultados obtenidos en la investigación



Anexo 26. Certificado de la ponencia



## Anexo 27. Representantes de la PUCESI en el IV Congreso Internacional de Medio Ambiente y Desarrollo



Anexo 28. Listado de participantes presentes en la socialización.



LISTA DE ASISTENCIA A SOCIALIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN

NOMBRE DEL EXPOSITOR: César Arturo Arcos Ortiz  
 CARRERA: Ing. Ciencias Ambientales y Ecodesarrollo  
 FECHA: 4 de Abril de 2019

NOMBRE ASISTENTE	NÚMERO DE CÉDULA	INSTITUCIÓN A LA QUE REPRESENTA	FIRMA
Luis Gavilima	1004068374	UTN	
Levy Flores	1759504488	UTN	
Gonzalo Vazquez	100334725-4	ESPOL	
Cinthya Ortiz	100664492-3	EPN	
Vanessa Espinoza	100485698-3	UTN	
Carlos Rea	011014786-4	GPA	
Jonne Rivadeneira	010268579-7	MAE	
Sandra Calle	172218288-6	ESPE	
Leonela Samuiza	172192639-0	Universidad de Cuenca	
Juan Carlos Rea	0705842227	Universidad Azuay	
Aina Mayanacala	0302389671	U. de Cuenca	
Walter Padron	0103797965	U. de Cuenca	
Esteban Bustamante	0704633742	U. de Cuenca	
Cristina Méndez	1032388290	UCE	
Wilson Criollo	010100305-8	U. de Azuay	
Bryan Astillo	1001526752	UTN	
Anderson Trejo	1001542504	UTN	



Pontificia Universidad  
Católica del Ecuador

ESCUELA CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES  
ÁREA DE VINCULACIÓN CON LA COMUNIDAD

LISTA DE ASISTENCIA A SOCIALIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN

NOMBRE DEL EXPOSITOR: César Arturo Areos Ortiz  
CARRERA: Ing. Ciencias Ambientales y Ecodesarrollo  
FECHA: 4 de Abril de 2019

NOMBRE DEL EXPOSITOR:  
CARRERA:  
FECHA:

NOMBRE ASISTENTE	NÚMERO DE CÉDULA	INSTITUCION A LA QUE REPRESENTA	FIRMA
Jairo Melto	1700584412	Parado Concepcion	
M <sup>a</sup> Gabriela Andrade	1004034946	UTN	
Mercedes Pazmino	0101001593	GPA	
Unico Rodriguez	1715502256	UCE	
Marceles Naranjo	1714525530	U.I. SER	
Ruth Correa	0502745730	UISEK	
Daniel Cantelajama	0701466321	U Azuay	
Castro Carlos	0102885356	EPN	
Andrés Ruiz	171163695-3	UCE	

Anexo 29. Encuesta de la socialización de la investigación.



**PROCESO DE SOCIALIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN**

El siguiente cuestionario nos permitirá implementar mejoras constantes en los procesos de socialización de trabajos de investigación, por favor háganos llegar sus comentarios y sugerencias:

<b>FECHA</b>				
<b>EXPOSITOR</b>				
<b>LUGAR</b>	<b>DENTRO PUCESI</b>		<b>FUERA PUCESI</b>	

**NOTA IMPORTANTE:** Por favor conteste las preguntas según la siguiente escala:

**5. MUY ALTO / 4. ALTO / 3. MEDIO / 2. BAJO / 1. NULO**

<b>DETALLE DE VALORACIÓN</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>ORGANIZACIÓN DEL EVENTO DE SOCIALIZACIÓN:</b>					
¿Considera Usted que la sala donde se desarrolló este evento brindó las comodidades necesarias?					
¿Considera Usted que el material audiovisual utilizado en la presentación fue adecuado?					
<b>EJECUCIÓN DEL EVENTO POR PARTE DEL EXPOSITOR</b>					
¿Considera Usted que el expositor mostró dominio del tema?					
¿Estima Usted que el manejo del auditorio por parte del expositor fue adecuado?					
¿Considera Usted que el Expositor demostró facilidad de expresión?					
<b>MEDICIÓN DE IMPACTO DE LA INVESTIGACIÓN:</b>					
¿Considera Usted que el tema investigado posee relevancia para algún actor y/o sector de la sociedad?					
¿Considera Usted que esta investigación posee perspectivas para estudios complementarios posteriores?					
¿Considera Usted que el tema investigado genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización, empresa pública o privada, comunidad o institución?					
¿En función de los objetivos planteados expuestos en la investigación, considera Usted que éstos se cumplieron?					
<b>REALICE UN COMENTARIO O SUGERENCIA PARA LOS ORGANIZADORES DE ESTE EVENTO</b>					
<b>MENCIONE USTED OTRAS PROBLEMÁTICAS QUE A SU PARECER PODRÍAN SER INVESTIGADAS Y QUE POSEAN IMPORTANCIA PARA ALGÚN ACTOR Y/O SECTOR DE NUESTRA COLECTIVIDAD</b>					
<b>INSTITUCIÓN U ORGANIZACIÓN A LA QUE PERTENECE EL ENCUESTADO</b>					

Anexo 30. Análisis de la tabulación de los resultados de la socialización de la investigación.

