



UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIERÍA EN ECOSISTEMAS

**DIVERSIDAD MICROBIANA Y POTENCIAL BIORREMEDIADOR EN AGUAS
CONTAMINADAS CON METALES PESADOS DEL RÍO JATUNYACU, NAPO:
CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN SEGÚN EXPOSICIÓN**

Proyecto de investigación previo a la obtención del Título de:

INGENIERA EN ECOSISTEMAS

AUTOR: LUZ CLARA VILLAFUERTE ORDOÑEZ

TUTOR: PhD. SILVIA ALEJANDRA LLERENA GORDILLO

Tena – Ecuador

2025

Carrera de Ecosistemas

Declaración de derecho de autor, autenticidad y responsabilidad

Tena, 14 de marzo 2025

Yo, Luz Clara Villafuerte Ordoñez, con documento de identidad 2101069835, declaro que los resultados obtenidos en la investigación que presento en este documento final, previo a la obtención del título Ingeniería en Ecosistemas, son absolutamente inéditos, originales, auténticos y personales.

En virtud de lo cual, el contenido, criterios, opiniones, resultados, análisis, interpretaciones, conclusiones, recomendaciones y todos los demás aspectos vertidos en la presente investigación son de mi autoría y de mi absoluta responsabilidad.



Luz Clara Villafuerte Ordoñez

CI: 2101069835

Carrera de Ecosistemas

Autorización de publicación en el repositorio institucional

Tena, 14 de marzo del 2025

Yo, Luz Clara Villafuerte Ordoñez, con documento de identidad 2101069835 en calidad de autor titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación Diversidad microbiana con potencial biorremediador en aguas contaminadas con metales pesados del río Jatunyacu, Napo: Caracterización y evaluación según exposición, de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN, reconozco a favor de la Universidad Regional Amazónica Ikiam una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Así mismo autorizo a la Universidad Regional Amazónica Ikiam para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el Repositorio Institucional de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de la Educación Superior



Luz Clara Villafuerte Ordoñez

2101069835

Carrera de Ecosistemas

Certificado de dirección de trabajo de titulación

Tena, 14 de marzo del 2025

Certifico que el trabajo de titulación “Diversidad microbiana con potencial biorremediador en aguas contaminadas con metales pesados del río Jatunyacu, Napo: Caracterización y evaluación según exposición”, aprobado bajo el mecanismo de titulación de artículo, fue realizado por Luz Clara Villafuerte Ordoñez, bajo mi dirección. El mismo ha sido revisado en su totalidad y analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad Regional Amazónica Ikiam, para su entrega y defensa.



Silvia Alejandra Llerena Gordillo

CI: 1715410625

Tutora

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios primeramente por permitirme la vida para lograr mis metas. Agradezco a mis padres por su apoyo constante e incondicional para cumplir mis sueños. Agradezco a mis hermanas, hermanos y familia por su apoyo incondicional y confianza en mí.

Agradezco a mi tutora de tesis Silvia Alejandra Llerena por su apoyo y enseñanza durante el transcurso de mi carrera. Agradezco a Evelyn Oña técnica de laboratorio, por su paciencia y guianza durante esta etapa. Agradezco al proyecto interno de investigación Un microcosmos por descubrir impactos ambientales de los microorganismos en las comunidades de Tena, por el apoyo y financiamiento que hizo posible la realización de esta investigación.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi padre Mentor Villafuerte y mi madre Flora Ordoñez.

TABLA DE CONTENIDO

PORTADA

DECLARACIÓN DE DERECHO DE AUTOR, AUTENTICIDAD Y RESPONSABILIDAD	II
AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL.....	III
CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN.....	IV
DEDICATORIA.....	VI
TABLA DE CONTENIDO.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
INDICE DE ANEXOS	XI
RESUMEN.....	XII
ABSTRACT	XIII
INTRODUCCIÓN.....	2
RESULTADOS.....	4
Análisis de metales pesados de las muestras de agua.....	4
Microorganismos aislados: identificación morfológica y molecular	6
Diversidad microbiana según distancia y profundidad	11
DISCUSIÓN	14
MÉTODOS	18
Colecta de muestras.....	18
Análisis de metales pesados.....	19
Fase de laboratorio	19
Diluciones seriadas.....	19
Inoculación de muestras de agua.....	20
Identificación de microorganismos aislados	20
Obtención de cultivos axénicos.....	20
Extracción de ADN método de boiling	21
Amplificación por PCR y Secuenciación.....	21
Revisión bibliográfica del potencial biorremediador de hongos y bacterias	22

Análisis estadístico	22
----------------------------	----

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANEXOS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Resultados del análisis de metales pesados. Se presentan las concentraciones de los metales de una muestra compuesta de los tres puntos de muestreo y Normativa ecuatoriana para el consumo humano.	5
Tabla 2: Identificación molecular de hongos aislados. La tabla muestra información de muestras de hongos que fueron secuenciadas, la profundidad en la que fueron aisladas y el porcentaje de identidad.....	8
Tabla 3: Identificación molecular de bacterias aisladas. La tabla contiene información de las muestras que bacterias que fueron secuenciadas, la profundidad en la que fueron aisladas y el porcentaje de identidad con respecto a BLAST.	9

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig 1: Imágenes de las bacterias aisladas	6
Fig 2: Imágenes de los hongos aislados	7
Fig. 3: Abundancia de mircoorganismos aislados	10
Fig. 4: Índice de diversidad Shannon.....	11

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Permiso de acceso a recursos genéticos	3
Anexo 2: Análisis de Metales pesados.....	3
Anexo 3: Imagen de gel de muestras de bacterias desde la muestra B41-B65.....	4
Anexo 4: Imagen de gel de muestras de hongos desde la muestra 20h-50H.	5

RESUMEN

La explotación minera ha aumentado las concentraciones de metales pesados en los ríos de la provincia de Napo, amenazando la salud y la biodiversidad. Los estudios sobre la diversidad de microorganismos en aguas contaminadas son fundamentales para identificar las especies y su potencial para proponer estrategias como la biorremediación. Por lo tanto, esta investigación se centró en el estudio de la diversidad microbiana según la distancia a la fuente de contaminación por metales pesados y la profundidad en el río Jatunyacu, en Napo, Ecuador. El estudio se realizó en una zona afectada por la minería ilegal. Se recolectaron muestras de agua para el aislamiento de hongos y bacterias en diferentes posiciones, dependiendo de la distancia a la fuente de exposición y la profundidad: punto 1 a 300 m del área de intervención, P2 a 200 m y P3 a 100 m. Las profundidades seleccionadas fueron superficiales (20 cm), media (40 cm) y profunda (80 cm). Con las muestras se realizó aislamiento por el método de dilución y cultivo por extensión en placa, caracterización morfológica, e identificación molecular mediante secuenciación de amplificación de regiones 16S con los cebadores 16S rRNA (bacterias) e ITS con los cebadores ITS2 e ITS5. La riqueza de especies varía dependiendo de la distancia al área de contaminación. A medida que se aleja de la fuente de contaminación, la riqueza de especies de hongos disminuye. En particular, el punto de muestreo más alejado, a 300 metros de la zona contaminada, mostró una mayor diversidad con un índice de Shannon de 0.94. Además, se encontró que la especie *Aspergillus fumigatus* tiene una amplia distribución dependiendo de la profundidad. En cuanto a la diversidad de bacterias aisladas, se encontró que la diversidad se concentra en los filos Actinobacteria y Proteobacteria. En términos de potencial de biorremediación, se destacó que los hongos filamentosos aislados tienen aplicaciones prometedoras en la biorremediación de metales pesados.

Palabras clave: abundancia, axénico, identificación molecular, índice de Shannon, minería.

ABSTRACT

Mining exploitation has increased concentrations of heavy metals in the rivers of Napo province, threatening health and biodiversity. Studies on the diversity of microorganisms in contaminated waters are essential to identify the species and their potential to propose strategies such as bioremediation. Therefore, this research focused on the study of microbial diversity according to the distance to the source of heavy metal contamination and depth in the Jatunyacu River, in Napo, Ecuador. The study was carried out in an area affected by illegal mining. Water samples were collected for the isolation of fungi and bacteria in different positions, depending on the distance to the source of exposure and depth: point 1 at 300 m from the intervention area, P2 at 200 m and P3 at 100 m. The selected depths were superficial (20 cm), medium (40 cm) and deep (80 cm). Isolation was carried out with the samples by the dilution method and culture by extension in plating, morphocultural characterization, and molecular identification by amplification sequencing of 16S regions with the 16S rRNA primers (bacteria) and ITS with the primers ITS2 and ITS5. Species richness varies depending on the distance to the contamination area. As you move away from the pollution source, fungal species richness decreases. In particular, the furthest sampling point, 300 meters from the contaminated area, showed greater diversity with a Shannon index of 0.94. In addition, it was found that the *Aspergillus fumigatus* species has a wide distribution depending on depth. Regarding the diversity of isolated bacteria, it was found that the diversity is concentrated in the phyla Actinobacteria and Proteobacteria. In terms of bioremediation potential, it was highlighted that the isolated filamentous fungi have promising applications in the bioremediation of heavy metals.

Keywords: abundance, axenic, molecular identification, Shannon index, mining.

Revista: Nature Microbiology:

<https://www.nature.com/nmicrobiol/submission-guidelines>

**DIVERSIDAD MICROBIANA CON POTENCIAL BIORREMEDIADOR EN AGUAS
CONTAMINADAS CON METALES PESADOS DEL RÍO JATUNYACU, NAPO:
CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN SEGÚN EXPOSICIÓN**

Villafuerte Luz1*, Evelyn Oña1 & Silvia Llerena2,

1 Universidad Regional Amazónica Ikiam, Tena, Ecuador

2 Universidad Regional Amazónica Ikiam, Grupo de Investigación Ecosistemas Tropicales
y Cambio Global,

Tena 150102, Ecuador.

*Autor de correspondencia: luz.villafuerte@est.ikiam.edu.ec

Introducción

La contaminación por metales pesados es una de las principales amenazas para los ecosistemas acuáticos a nivel global [1]. Los ecosistemas lóticos, como ríos y arroyos, son propensos a la contaminación por metales pesados debido a su dinámica hidrológica y papel crucial en el transporte de contaminantes a través del paisaje [2,3]. En la Amazonía ecuatoriana, estos impactos ambientales son constantes a causa de la presencia de actividades mineras legales e ilegales, que contribuyen al aumento de las concentraciones de estos elementos en el agua [4].

Las investigaciones realizadas por Caparrelli y colaboradores, alrededor del río Napo, han revelado la presencia de concentraciones excesivas de metales pesados en el agua y los sedimentos [2]. Por ejemplo, niveles de cadmio y arsénico que superan en hasta 600 y 52 veces los estándares establecidos por la normativa ecuatoriana, la cual fija un límite máximo permisible de 0.005 mg/L para cadmio y 0.01 mg/L para arsénico en aguas dulces destinadas al consumo humano [3]. Estas elevadas concentraciones de metales pesados representan un riesgo significativo para la salud humana y afectan negativamente la diversidad microbiana y el equilibrio ecológico de los ecosistemas acuáticos [5].

Dentro de los organismos afectados, están los microorganismos. La composición de las comunidades microbianas puede alterarse debido a la exposición a los metales, esto a su vez afecta la capacidad de los ecosistemas acuáticos para mantener su equilibrio ecológico. Los microorganismos presentes en el agua son cruciales en el mantenimiento del equilibrio ecológico, gracias a su capacidad de adaptación a los contaminantes. Esta adaptación permite que las funciones vitales, continúen a pesar de la presencia de estos contaminantes en el agua [5]. Los hongos y bacterias facilitan la transformación y mitigación de la contaminación por metales, al estar relacionados con la movilización, la especiación y la toxicidad de estos compuestos [6]. Además, su capacidad para degradar y detoxificar los metales pesados abre posibilidades para el desarrollo de estrategias de

biorremediación efectivas, que podrían contribuir significativamente a la restauración de la calidad del agua y de los ecosistemas acuáticos [5].

Sin embargo, en la Amazonía Ecuatoriana se registran pocos estudios relacionados con diversidad microbiana en ecosistemas impactados, se desconoce cómo la presencia de estos elementos determina la composición de las comunidades microbianas [7]. La falta de información es una limitante para comprender la respuesta microbiana a la contaminación por metales pesados y el desarrollo de estrategias de mitigación [2]. Por ello es fundamental caracterizar la diversidad microbiana y potencial uso en biorremediación. Esta información es relevante para determinar la salud del ecosistema y la calidad del recurso hídrico.

El río Jatunyacu en Napo está siendo afectado por actividades de minería ilegal, tanto con maquinaria pesada como artesanal [2]. Este río, que es una subcuenca del río Napo, constituye una fuente vital de agua para las comunidades locales en la provincia de Napo. Investigaciones previas han revelado la presencia de niveles elevados de metales. En un estudio anterior en el que se tomaron muestras en 14 puntos de muestreo a lo largo del río Napo, incluido el río Jatunyacu, reportó niveles de cadmio (Cd) que oscilaron entre 46,0 y 10,6 $\mu\text{g/l}$, superando los límites permitidos para el agua de uso potable [4].

En otros estudios se observó que la distancia a la fuente de exposición afecta a la diversidad microbiana. Zou y colaboradores determinaron en muestras de suelo que a medida que aumentaba la distancia de la zona minera, la diversidad bacteriana aumentaba y que esta diversidad principalmente a los grupos Proteobacteria, Actinobacteriota, Chloroflexi y Firmicutes [5].

Otro factor que se relaciona con la exposición a la contaminación es la profundidad. Según Santiago y colaboradores la capa superficial es la zona más expuesta a la contaminación directa, lo que puede influir en la presencia y actividad de los microorganismos. La capa media proporciona una perspectiva sobre cómo los contaminantes y los microorganismos se distribuyen y mezclan en el agua en un rango

intermedio. En la zona más profunda pueden establecerse comunidades microbianas adaptadas a condiciones desfavorables [8].

Con lo antes expuesto se evidencia que existen escasos estudios sobre la diversidad de microorganismos relacionados a la exposición a metales pesados según su distancia y profundidad. Para abordar esta brecha, este estudio tuvo como objetivo caracterizar la diversidad microbiana con potencial biorremediador de metales pesados del río Jatunyacu tomando en cuenta distancia a la zona contaminada y profundidad. Esta información es relevante porque permite entender cómo la diversidad microbiana varía en función de la proximidad a fuentes de contaminación y la profundidad, lo que es crucial para identificar microorganismos con potencial para la biorremediación y optimizar las estrategias de remediación ambiental.

Resultados

Análisis de metales pesados de las muestras de agua

Con respecto a los resultados reportados del análisis de metales, en contraste con la Norma de Calidad del Agua para Consumo Humano del Ecuador 2015, los metales como Cd con un valor de 0.002 está cercano al límite de 0.003 y Hg con un valor de 0.002 supera el límite permisible de 0.001 presente en la normativa (**Tabla 1**).

Tabla 1: Resultados del análisis de metales pesados. Se presentan las concentraciones de los metales de una muestra compuesta de los tres puntos de muestreo y Normativa ecuatoriana para el consumo humano.

PARÁMETROS	UNIDADES	RESULTADOS	N. ECUATORIANA	INCERTIDUMBRE U (k=2)
(a)	mg/l	<0,080	0.2	± 5,80 %
ALUMINIO				
(a)	mg/l	<0,002	0.005	± 5,14 %
ANTIMONIO				
(a)	mg/l	0.00277	0.01	± 10,12 %
ARSÉNICO				
(a)	mg/l	0.0484	1	± 7,37 %
BARIO				
(a)	mg/l	<0,002	0.005	± 7,34 %
BERILIO				
(a)	mg/l	<0,160	NA	± 13,77 %
BORO				
(a)	mg/l	<0,002*	0.003	± 19,68 %
CADMIO				
(a)	mg/l	0,0438	NA	± 9,94 %
CALCIO				
(a)	mg/l	<0,002	0.05	± 7,35 %
COBALTO				
(a)	mg/l	<0,012	1	± 8,23 %
COBRE				
(a)	mg/l	<0,002	NA	± 8,56 %
CROMO				
(a)	mg/l	<0,002	NA	± 10,75 %
ESTAÑO				
(a)	mg/l	0,178	NA	± 9,32 %
ESTRONCIO				
(a)	mg/l	<0,080	0.3	± 11,63 %
HIERRO				
(a)	mg/l	238	0.01	± 9,81 %
LITIO				
(a)	mg/l	<0,002	0.5	± 8,04 %
MAGNESIO				
(a)	mg/l	<0,002	0.001	± 6,42 %
MANGANESO				
(a)	mg/l	<0,002*	0.001	± 13,48 %
MERCURIO				
(a)	mg/l	<0,0147	0.02	± 7,08 %
MOLIBDENO				
(a)	mg/l	<0,002	0.02	± 21,81 %
NÍQUEL				
(a)	mg/l	<0,002	0.01	± 10,19 %
PLATA				

Fuente: Normativa Ecuatoriana de calidad de agua para el consumo humano, 2015.

Microorganismos aislados: identificación morfológica y molecular

Del total de 162 muestras inoculadas se obtuvo un total de 59 hongos axénicos y 36 bacterias puras. Algunas de las muestras inoculadas no mostraron crecimiento en las respectivas placas en ninguno de los factores de dilución. Las bacterias aisladas compartieron una morfología similar, con coloración amarilla, blanca y textura pegajosa (**fig.1**). Con una cinética de crecimiento de aparición de las colonias en las primeras 24 horas a una temperatura de incubación de 37°C.

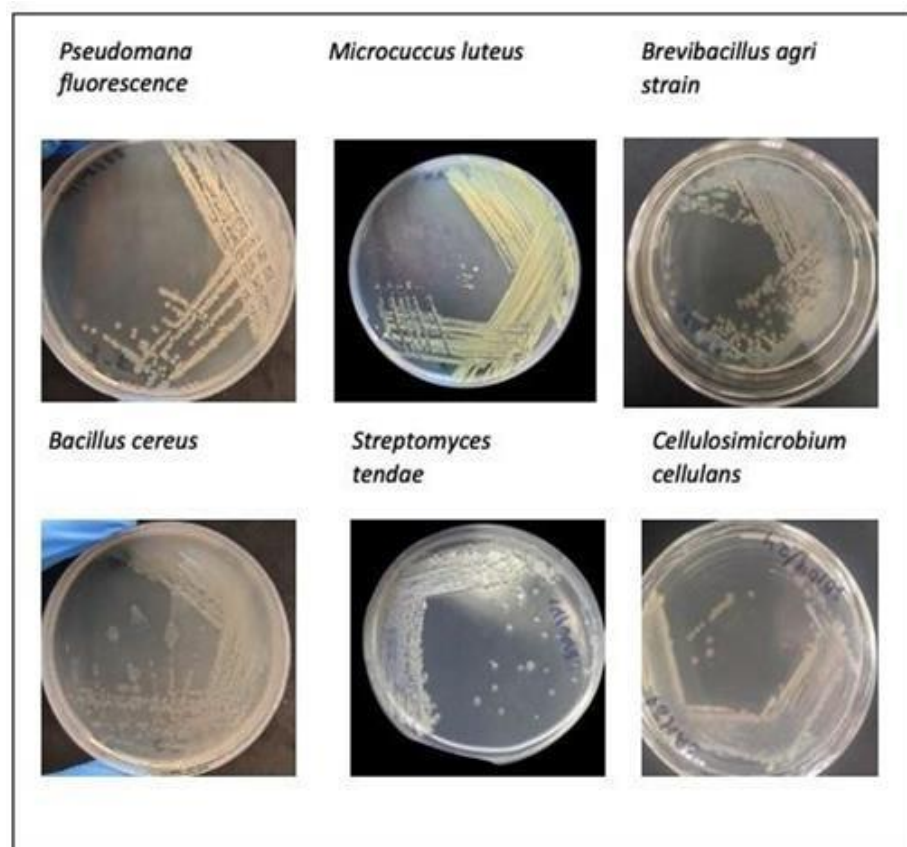


Fig 1: Imágenes de las bacterias aisladas.
Realizado por: Villafuerte, 2024

Los hongos aislados presentaron las siguientes características morfológicas: coloración blanca y micelio filamentoso, coloración verde con abundantes esporas y textura polvorienta. Los hongos blancos filamentosos presentaron un crecimiento radial del micelio, colonizando las placas de forma completa posterior a los 14 días de incubación. Las levaduras obtenidas mostraron coloración rosa intensa, textura pegajosa y crecimiento lento, mientras que las levaduras de coloración verde presentaron crecimiento invasivo, con un total de 6 o 7 individuos por placa (**fig.2**).

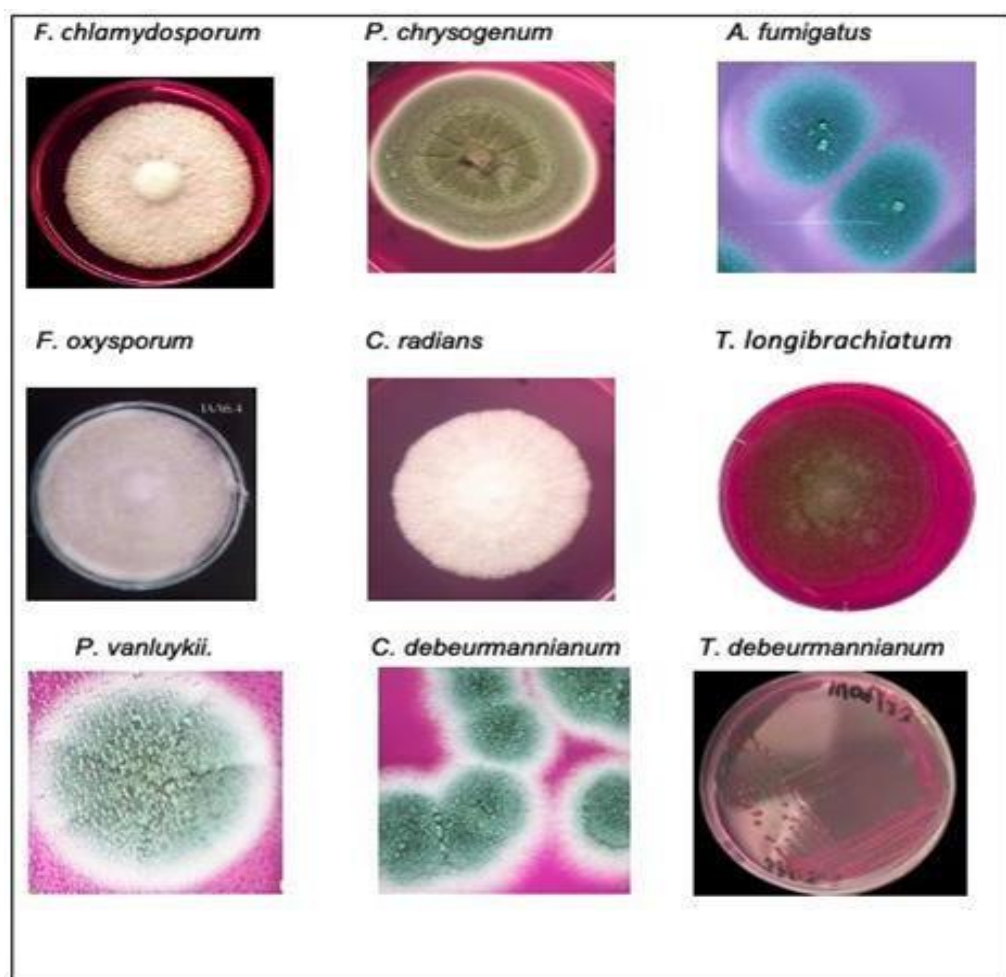


Fig 2: Imágenes de los hongos aislados.

Realizado por: Villafuerte, 2024

El análisis con las secuencias obtenidas utilizando la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) mediante Nucleotide BLAST resultó en un porcentaje de similitud de identidad mayor al 94 %, oscilando en su mayoría entre 97 y 98 % y E-value, cercano a 0,0 (**Tabla 2**).

Tabla 2: Identificación molecular de hongos aislados. La tabla muestra información de muestras de hongos que fueron secuenciadas, la profundidad en la que fueron aisladas y el porcentaje de identidad.

Punto de muestreo	Profundidad	Especie identificada	Filo	% Identidad BLAST
Punto 1	Alta	<i>Fusarium chlamydosporum</i>	Ascomycota	98.60 %
Punto 1	Alta	<i>Daldinia eschscholtzii</i>	Ascomycota	97.88 %
Punto 1	Media	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Ascomycota	98.41 %
Punto 3	Alta	<i>Cutaneotrichosporon debeurmannianum</i>	Basidiomycota	94.12 %
Punto 3	Alta	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ascomycota	97.26 %
Punto 1	Alta	<i>Coprinellus radians</i>	Basidiomycota	98.99 %
Punto 1	Alta	<i>Coprinellus radians</i>	Basidiomycota	98.99 %
Punto 1	Media	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ascomycota	97.97 %
Punto 3	Profunda	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Ascomycota	97.97 %
Punto 3	Profunda	<i>Trichosporon debeurmannianum</i>	Ascomycota	98.16 %
Punto 1	Alta	<i>Daldinia eschscholtzii</i>	Ascomycota	97.88 %
Punto 3	Alta	<i>Cutaneotrichosporon debeurmannianum</i>	Basidiomycota	98.48 %
Punto 3	Alta	<i>Fusarium oxysporum</i>	Ascomycota	98.84 %

Fuente: Blastn, 2024.

En el caso de las bacterias del análisis utilizando la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) mediante Nucleotide BLAST se obtuvo porcentajes de identidad, mayor al 99 % y E-value, cercano a 0,0 (**Tabla 3**).

Tabla 3: Identificación molecular de bacterias aisladas. La tabla contiene información de las muestras que bacterias que fueron secuenciadas, la profundidad en la que fueron aisladas y el porcentaje de identidad con respecto a BLAST.

Punto de muestreo	Profundidad	Especie identificada	Filo	% de Identidad BLAST
Punto 1	Media	<i>Pseudomona fluorescense</i>	Proteobacteria	99.21 %
Punto 2	Media	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	Actinobacteria	99.69 %
Punto 1	Medio	<i>Bacillus cereus</i>	Firmicutes	99.60 %
Punto 2	Profunda	<i>Brevibacillus agri strai</i>	Firmicutes	99.90 %
Punto 3	Profunda	<i>Micrococcus luteus</i>	Actinobacteria	99.60 %

Fuente: Blastn, 2024

Abundancia de microorganismos aislados con respecto a los puntos de muestreo y profundidades

En los resultados obtenidos se muestra la abundancia de microorganismos aislados se observaron las siguientes abundancias: En el punto 1A, *Trichosporon debeurmannianum* representa el 15 %, *Daldinia eschscholtzii* el 15 %, *Coprinellus radians* el 65 % y *Aspergillus Fumigatus* el 5 %. En el punto 1M, *Trichosporon debeurmannianum* constituye el 12 %, *Daldinia eschscholtzii* el 20 %, y *Coprinellus radians* el 63 %. En el punto 1P, *Penicillium chrysogenum* domina con un 95 % y *Aspergillus Fumigatus* tiene un 5 %. En el punto 2A, *Fusarium chlamydosporum* está presente con un 47 %, *Daldinia eschscholtzii* con un 48 % y *Aspergillus Fumigatus* con un 5 %. En el punto 2M, *Trichoderma longibrachiatum* constituye el 49 %, *Coprinellus radians* el 26 % y *Aspergillus Fumigatus* el 25 %. En el punto 2P, *Trichoderma longibrachiatum* tiene un 52 %, *Cutaneotrichosporon debeurmannianum* un 32 % y *Aspergillus Fumigatus* un 16 %. En el punto 3A, *Fusarium oxysporum* está presente con un 31 %, *Cutaneotrichosporon debeurmannianum* con un 42 % y *Trichoderma longibrachiatum* con un 27 %. En el punto 3M, *Aspergillus Fumigatus* domina con un 95 % y *Cutaneotrichosporon debeurmannianum* con un 5 %. Finalmente, en el punto 3P, *Aspergillus Fumigatus* está presente al 100 % (fig. 3a).

Con respecto a la abundancia de bacterias la (fig. 3b), muestra que *Pseudomona fluorescence* está presente con una abundancia del 100 %. En el punto 1M, tanto *Pseudomona fluorescence* como *Bacillus cereus* presentan una abundancia del 50 % cada uno. En el punto 1P, *Pseudomona fluorescence* sigue siendo el único microorganismo con una abundancia del 100 %. En el punto 2M, *Cellulosimicrobium cellulans* es el microorganismo exclusivo con una abundancia del 100 %. En el punto 2P, *Streptomyces tendae* está presente con una abundancia del 100 %. Finalmente, en el punto 3P, *Micrococcus luteus* predomina con una abundancia del 90 %, mientras que *Brevibacillus agri* strain tiene un 10 %.

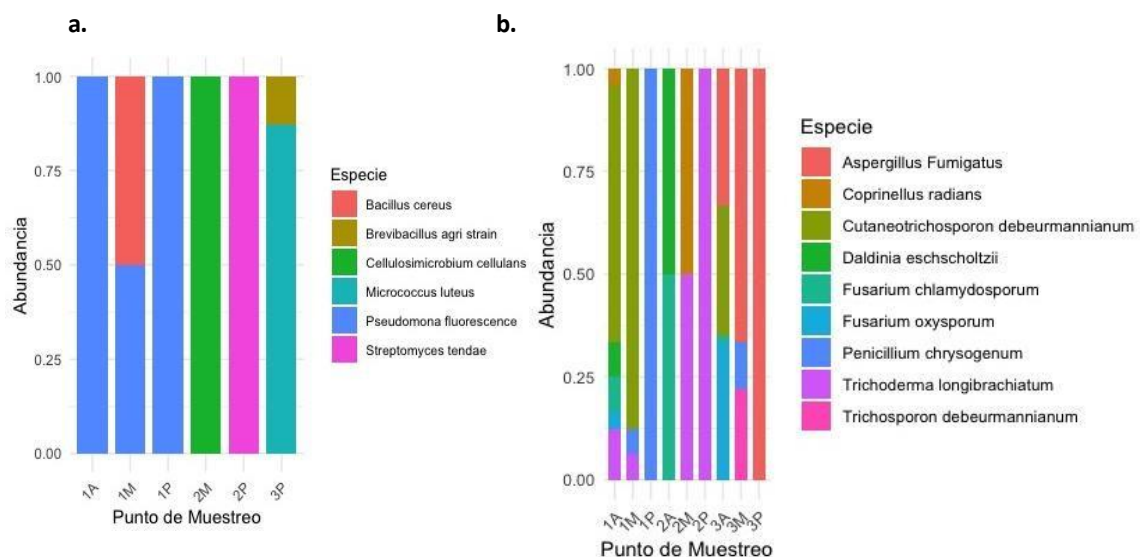


Fig. 3: Abundancia de mircoorganismos aislados con respecto a los puntos de muestreo y profundidades. a) Esta figura muestra la abundancia relativa de especies de hongos en los respectivos puntos de muestreo y profundidades representados en el eje x. Donde 1A corresponde al punto 1 con una profundidad superficial y sucesivamente cada punto. **b)** Esta figura muestra la abundancia relativa de especies de bacterias en los respectivos puntos de muestreo y profundidades representados en el eje x. Donde 1A corresponde al punto 1 con una profundidad superficial y sucesivamente cada punto.

Realizado por: Villafuerte, 2024

Diversidad microbiana según distancia y profundidad

Los datos presentados corresponden a los índices de diversidad de Shannon obtenidos en diferentes puntos de muestreo y profundidades en el estudio. Para el punto de muestreo 1, el índice es 0.656 en la profundidad Alta, 0.939 en la profundidad Media, y 0.067 en la profundidad mas baja. En el punto 2, los valores son 0.693 en la profundidad Alta, 0.155 en la profundidad M, y 0.530 en la profundidad P. Finalmente, para el punto de muestreo 3, los índices son 0.912 en la profundidad A, 0.849 en la profundidad M, y 0.828 en la profundidad P.

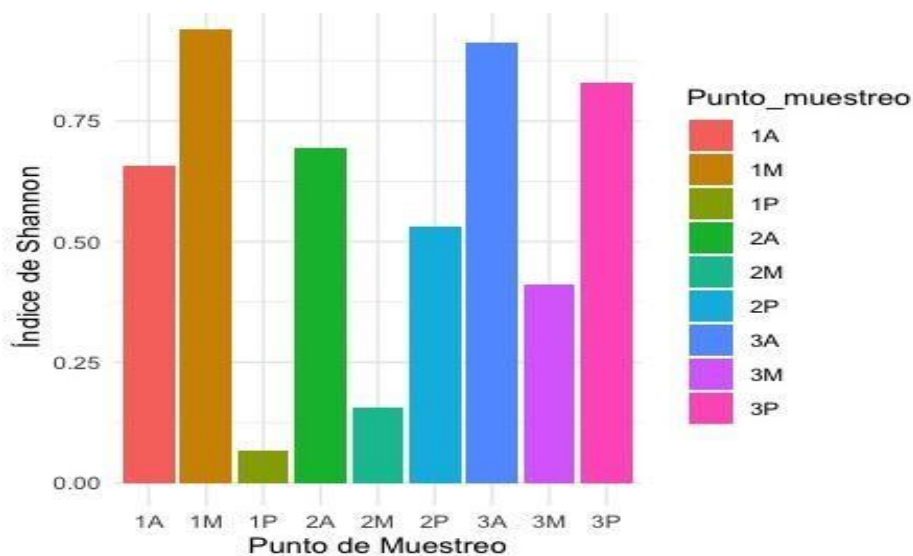


Fig. 4: Índice de diversidad Shannon. Representa los índices de diversidad con respecto a punto de muestreo y profundidad.

Realizado por: Villafuerte, 2024

Análisis estadístico

En análisis de varianza ANOVA para la variable puntos de muestreo y riqueza de especies de hongos con un p valor de (0.000764) muestra que existen diferencias significativas, entre la riqueza de especies considerando los puntos de muestreo y profundidad. Con respecto a la riqueza de bacterias por puntos y muestreo y profundidad no existen diferencias significativas con un p valor (0.0729).

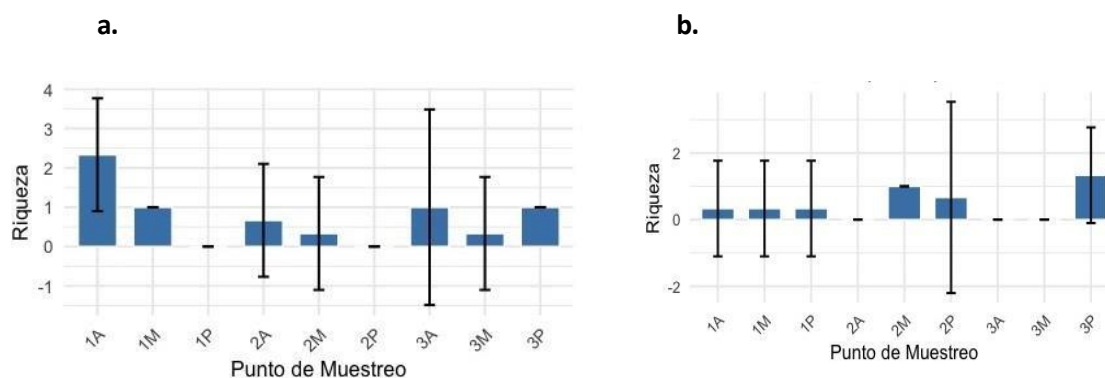


Fig. 5: Riqueza de microorganismos aislados con respecto a los puntos de muestreo y profundidades. a) Riqueza de especies de hongos en los respectivos puntos de muestreo y profundidades. **b)** Riqueza de especies de bacterias en los respectivos puntos de muestreo y profundidades.

Realizado por: Villafuerte, 2024

En análisis de varianza ANOVA para la variable puntos de muestreo en la relación con los índices de Shannon de especies de hongos con un p valor de (0.3058) muestra que no existen diferencias significativas, entre la índices considerando los puntos de muestreo y profundidad.

Potencial biorremediador de los microorganismos identificados por revisión bibliográfica

De la revisión bibliográfica realizada sobre los microorganismos aislados e identificados se obtuvo que los hongos *F. oxysporum*, *Penicillium chrysogenum*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Aspergillus fumigatus*, *Coprinellus radians* y las bacterias *Cellulosimicrobium cellulans*, *Bacillus cereus*, *Brevibacillus agri*, *Micrococcus luteus*, han presentado actividad en biorremediación como se detalla a continuación:

La literatura muestra en una investigación realizada por Awasthi y colaboradores el potencial de *Fusarium* para sintetizar nanopartículas de plata (AgNP), descubrieron que la enzima nitrato reductasa, que depende de NADH y es secretada por *F. oxysporum*, es la responsable de reducir los iones de plata acuosos y convertirlos en AgNP [14]. Otro estudio realizado por Xu y otros investigó cómo el hongo *Penicillium chrysogenum* maneja la contaminación por cadmio (Cd), mostrando que el cadmio se adhiere

principalmente a la pared celular del hongo. Con concentraciones crecientes de cadmio, el hongo experimenta un aumento significativo en el daño oxidativo y activa varios sistemas antioxidantes, como el superóxido dismutasa, el glutatión reductasa y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Estos mecanismos incluyen biosorción, secuestro celular y defensa antioxidante para desintoxicar el cadmio [15].

Andreolli *et al.* abordaron el tema de biorremediación aplicando la especie *Trichoderma longibrachiatum* como biocatalizador para remediar suelos contaminados con metales. Esta especie puede aumentar la biodegradación de metales. Los hallazgos indican que *T. longibrachiatum* puede ser un inóculo adecuado en protocolos de biorremediación para la recuperación de suelos contaminados [16].

Con respecto a *Aspergillus fumigatus*, Kumar *et al.* Investigaron sobre la capacidad de biosorción de *Aspergillus fumigatus* para eliminar metales tóxicos como plomo, cromo, cadmio, níquel, cobre y zinc a diferentes concentraciones y condiciones de pH y temperatura. El aislado de *A. fumigatus* tiene alta capacidad de biosorción para plomo, seguido de cobre y cromo. Los hallazgos sugieren que estos hongos podrían ser utilizados como biosorbentes naturales para tratar efluentes industriales contaminados con iones metálicos tóxicos [17].

Coprinellus radians las especies de este género están asociadas con la biotransformación de dibenzo -p -dioxina policlorada, son capaces de metabolizar 2,7-DCDD a un compuesto monohidroxilado, probablemente mediado por el sistema P450. Aquí se informa por primera vez sobre el metabolismo del DD clorado por hongos capaces de vivir en las condiciones del suelo [18].

Un estudio llevado a cabo por Bhargava *et al.* probó la efectividad de la bacteria *Cellulosimicrobium cellulans* en el campo de la biorremediación para la reducción de cromo hexavalente en aguas residuales de curtiembres. Esto la convierte en un agente potencial para la biorremediación de sitios contaminados con metales. Por lo tanto, Bharagava *et al.* afirman que la bacteria puede ser aplicada para biorremediación efectiva de sitios contaminados con metales [19].

La bacteria *Bacillus cereus* tiene alto potencial de acumulación de plomo, es una especie aplicable para la biorremediación del plomo debido a la presencia de genes y transportadores resistentes a metales pesados [20]. La cepa *Brevibacillus agri* es una bacteria tolerante a solventes orgánicos que puede estabilizar emulsiones de solvente en agua, lo que sugiere potencial como biocatalizador de células completas para la biotransformación de sustratos inmiscibles en agua.

Con respecto a *Micrococcus luteus* se conoce que la materia orgánica extracelular de *Micrococcus luteus* mejora la biorremediación ex situ de suelos contaminados con aceite lubricante usado, reduciendo las concentraciones iniciales entre un 37% y un 55% sin disminuir la toxicidad del suelo [21]. También se logró identificar a la bacteria *Pseudomona fluorescence*, esta tiene una resistencia notable a metales pesados como (Cr^{6+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+}) y pesticidas (BHC, 2,4-D, Mancozeb) a niveles de contaminantes típicos encontrados en áreas altamente contaminadas [22].

Discusión

Esta investigación muestra que la abundancia de las comunidades microbianas cambia en función de la distancia de los puntos de muestreo (**fig. 3**). La zona con mayores especies de hongos fue el punto 1 a una profundidad superficial de 20 cm este punto se encontraba a 300 m de la zona de origen de la actividad minera ilegal, más lejana (**fig .6**). Mientras que en el punto 3 más cercano al área seleccionada, presenta redundancia en las especies de hongos, predomina la especie *Aspergillus fumigatus* (**fig. 3**).

Una de las razones se debe a que esta especie identificada perteneciente al filo Ascomycota, tiene la capacidad de adaptarse a condiciones ambientales desfavorables. Este resultado obtenido con respecto a la diversidad identificada concuerda con previas investigaciones realizadas por Kumar *et al*, donde muestran que el filo Ascomycota es el más abundante en un ecosistema fluvial tropical con presencia de contaminantes. Además, estudios muestran que *Aspergillus fumigatus*, especie de hongo filamentoso saprófito en particular, puede adaptarse a diversas condiciones ambientales extremas, demostrando una elevada resistencia a los contaminantes [18].

Además, como resultado de esta investigación, se obtuvo que la distancia de los diferentes puntos de muestreo es un factor que influye en la riqueza de las comunidades microbianas [19]. Esta afirmación concuerda con un estudio realizado por Yingying *et al.*, en el cual comprobaron que la composición de las comunidades microbianas en zonas de actividades mineras está influenciada por la distancia. A medida que aumenta la distancia desde el área minera y el riesgo de exposición a los metales, la diversidad microbiana tiende a aumentar reportando especies diferentes. En contraste con estos datos, se muestra que en el punto de muestreo uno a profundidad media, el índice de diversidad es mayor (**fig. 4**), con presencia de diferentes especies como *Penicillium chrysogenum*, *Cutaneotrichosporon debeurmannianum* y *Trichoderma longibrachiatum* (**fig. 3**).

Con respecto a las bacterias, los metales pesados tienen un mayor impacto en la variación de las comunidades bacterianas [20], pueden afectar significativamente la estructura de las comunidades bacterianas, mostrando redundancia en la abundancia de bacterias y baja riqueza [20]. En esta investigación se identificó que, a nivel taxonómico, la diversidad de bacterias es redundante, donde predominan las Actinobacterias (**Tabla 2**), esta información concuerda con investigaciones realizadas por Li *et al*, donde las bacterias pertenecientes al filo Actinobacterias son abundantes en condiciones ambientales extremas [21,22].

La variable profundidad en este estudio permitió aislar bacterias que se especializan en una determinada profundidad. Como es el caso de la especie *Brevibacillus agri* strain, que se encontró únicamente en la profundidad de 80 cm (**fig 3**). Esto se debe a que la profundidad puede influir en la presencia de bacterias anaerobias y aerobias debido a los cambios en las condiciones ambientales [23]. En los resultados obtenidos se identificó bacterias anaerobias y aerobias, *Pseudomonas fluorescence* y *Micrococcus luteus* bacterias aerobias, *Micrococcus luteus*, *Cellulosimicrobium cellulans* y *Brevibacillus agri strain* bacterias anaerobias facultativas. *Bacillus cereus* y *Streptomyces tendae* también son bacterias anaerobias facultativas. Por lo que considerar la variable profundidad en el estudio de diversidad es un factor clave para conocer cómo se distribuyen las comunidades microbianas.

La diversidad bacteriana está estrechamente ligada a la profundidad del agua, con diferentes grupos taxonómicos que se distribuyen en función de la profundidad [24]. A medida que aumenta la profundidad, los patrones de abundancia y diversidad bacteriana se vuelven más complejos [25]. En particular, los filos Proteobacteria y Actinobacteria dominan los patrones de diversidad, y se encuentran presentes en diferentes profundidades [25]. En este estudio se encontró que *Pseudomonas fluorescens*, una especie del filo Proteobacteria, está ampliamente distribuida en diferentes puntos de muestreo y en las tres profundidades estudiadas (20cm, 40cm y 80cm), como se muestra en la (**Figura 3**), este resultado se mostró únicamente con esta especie, mientras que las demás especies de bacterias tienden a especializarse en diferentes profundidades. Sin embargo, es importante realizar estudios más extensos que incluyen una mayor variedad de puntos de muestreo y profundidades para obtener una visión más completa de cómo las condiciones ambientales afectan la distribución de las bacterias.

Los resultados del análisis estadístico mostraron que no existen diferencias significativas entre los índices de diversidad en relación con los puntos de muestreo y profundidad, con un p-valor de 0.3058. Este resultado indica que, según el análisis realizado, no se observan diferencias estadísticamente significativas en los índices de diversidad entre

los distintos puntos de muestreo y profundidades. Sin embargo, es importante considerar que este hallazgo puede estar influenciado por varios factores. El bajo número de especies detectadas en las muestras podría haber limitado la capacidad para captar diferencias significativas en la diversidad. Además, el tamaño de la muestra podría no haber sido suficiente para reflejar adecuadamente la variabilidad biológica presente en los sitios de muestreo. Para obtener una evaluación más precisa y confiable, se recomienda aumentar el número de muestras y mejorar el diseño del muestreo.

Por otro lado, esta investigación se centró en evaluar el potencial biorremediador de hongos y bacterias, basándose en una revisión bibliográfica. Según literatura científica, la mayoría de las especies de hongos filamentosos identificadas en este trabajo han sido probadas en el campo de la biorremediación, como lo afirma Li *et al*, en su investigación, reportando que los hongos filamentosos nativos de sitios contaminados con metales pesados son potenciales para la biorremediación. En particular, el estudio identificó al hongo filamentoso *Fusarium oxysporum*, que ha mostrado una alta capacidad de biosorción de mercurio (Hg). Esta especie exhibe una notable capacidad de biosorción del mercurio y presenta una alta resistencia, lo que sugiere un gran potencial como biorremediador para sustratos acuosos severamente contaminados con Hg [21].

Estos hallazgos son un aporte para entender cómo la composición de las comunidades microbianas está influenciada por la distancia a las zonas de contaminación y cómo este factor define la abundancia, diversidad y funcionalidad de los microorganismos [9]. Además, se obtuvieron datos relevantes, identificando hongos y bacterias con potencial aplicación en procesos de biorremediación. Este es un aporte a la investigación que puede beneficiar a la conservación de los ecosistemas acuáticos en la Amazonía. Sin embargo, se requieren mayores investigaciones y la implicación de factores ambientales en los estudios sobre diversidad microbiana. Conocer cómo las comunidades microbianas responden y se adaptan a los cambios en los ecosistemas acuáticos es uno de los factores a considerar para futuras investigaciones en el campo de la microbiología acuática en la Amazonía Ecuatoriana.

Métodos

Sitio de Estudio

El área de estudio está localizada en las coordenadas ($1^{\circ}03'30.6''S$ $77^{\circ}48'47.9''W$), en el río Jatunyacu, perteneciente a la parroquia Puerto Napo. La investigación se realizó con el respectivo permiso de investigación de acceso a recursos genéticos (MAATE-DBI-CM-2023-0308) (**fig 6**). Esta zona de estudio fue seleccionada en función de la información obtenida a través de informes del Ministerio de Ambiente, Agua y Transición Ecológica donde demuestra que se reportaron actividades de minería ilegal en esta zona.

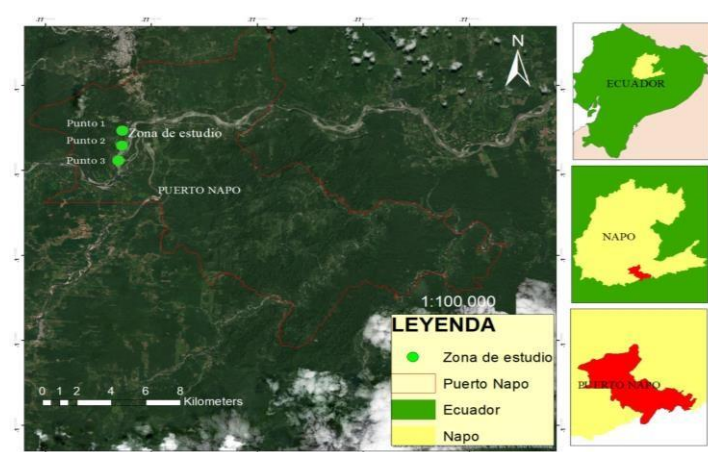


Fig. 6: Sitio de estudio río Jatunyacu provincia de Napo.
El sitio de estudio está ubicado en la provincia de Napo, parroquia Puerto Napo, en una zona donde se registraron actividades de minería ilegal.
Realizado por: Villafuerte, 2024

Colecta de muestras

Se recolectaron muestras de agua en tres puntos diferentes estos puntos se seleccionaron por accesibilidad al área que pertenecía a zona de minería ilegal en el sector Yutzupino parroquia Puerto Napo (**fig 3**). En total se tomaron tres muestras en cada punto de colecta con un respectivo volumen de 2 L, a diferentes profundidades: superficial, media y profunda las cuales se definieron con respecto a la profundidad de la zona y caudal, siendo la profundidad a 20 cm de la superficie inicial, profundidad

media a 40 cm y la más profunda a 80 cm, niveles de profundidad definidos de acuerdo con las condiciones cauce. Los puntos de muestreo se seleccionaron a una distancia de 100 m. El primer punto localizado en las coordenadas punto 1:1°03 '30 "S 77°48' 47"W este punto se encontraba más lejano a la zona de pasivo minero 300 m, el punto 2:1°03 '27 "S 77°48' 46"W a 200 m de la concesión minera y punto 3: 1°03 '25 "S 77°48' 43"W a 100 m de la concesión minera. Las respectivas muestras fueron almacenadas a una temperatura de 4°C como lo establece la Norma INEN 2169.

Análisis de metales pesados

Para este análisis de metales pesados las muestras fueron enviadas al Laboratorio Lasa. Debido al costo del análisis, la dificultad de acceso al sitio y al no ser la concentración una variable propuesta en anteproyecto aprobado, de las muestras recolectadas de todos los puntos se realizó una muestra compuesta que fue la analizada para determinar contaminantes como otro dato extra además de los expuestos en antecedentes. Los metales analizados fueron aluminio, antimonio, arsénico, bario, berilio, boro, cadmio, calcio, cobalto, cobre, cromo, estroncio, hierro, magnesio, manganeso, mercurio, molibdeno, níquel y plata, el análisis fue realizado a través del método de absorbancia atómica para un total de 21 metales.

Fase de laboratorio

Diluciones seriadas

Las diluciones se realizaron con agua peptonada, se dispusieron 9 mL de peptona en cada tubo de ensayo. Se tomó 1 mL de la muestra de agua y se diluyó hasta un factor de 10^{-9} para hongos y bacterias. A partir de la dilución madre se realizaron las demás diluciones seriadas de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} [19].

Inoculación de muestras de agua

En la fase de inoculación, se transfirió 100 µL de la dilución seriada. Para hongos, se inoculó la dilución con factores, 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , para cada factor de dilución se realizaron tres réplicas, considerando los puntos de muestreo y profundidades, donde se definieron tres réplicas por cada nivel de profundidad, se aislaron 27 muestras por punto. Para bacterias, se seleccionaron las diluciones con factores de, 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} [18], con este mismo factor de repeticiones. Dando un total de 162 aislados entre hongos y bacterias [19, 20].

Identificación de microorganismos aislados

Se utilizó la identificación macroscópica de hongos y bacterias para identificar especies basadas en sus características morfológicas. Este método implicó observar las características macroscópicas (forma, tamaño, color, textura, etc.) y microscópicas (estructura, esporas, etc.) del hongo, así como su comportamiento en cultivo [21]. Un enfoque similar se utilizó para bacterias, donde se observó la forma, color y tamaño de la colonia.

Obtención de cultivos axénicos

Los aislados obtenidos de las cajas madres se seleccionaron por características morfológicas para proceder a obtener axénicos. Seleccionado 59 hongos y 36 bacterias. Para obtener muestras puras de hongos y bacterias, se llevó a cabo un proceso de cultivo axénico. Para iniciar este proceso, se obtuvo una muestra de micelio puro del hongo, asegurando un tiempo de crecimiento óptimo de 14 días. Esto implicó seleccionar cuidadosamente una colonia de hongos en crecimiento activo, en una etapa temprana de desarrollo, donde la pureza del micelio era más alta. Se transfirió la colonia seleccionada a un medio de cultivo de agar rosa bengala. En el caso de las bacterias, se llevó a cabo un estriado en placa y se distribuyó uniformemente una muestra bacteriana sobre la superficie de un medio de cultivo sólido utilizando un asa bacteriológica esterilizada cita.

Extracción de ADN método de boiling

La extracción de ADN se llevó a cabo mediante el método de Boiling. Se basó en la desnaturalización del ADN a altas temperaturas, seguida de la renaturalización del ADN a temperaturas más bajas. Inicialmente, se agregó 500 µl de Buffer TE 1X a un tubo de 1.5 ml, y se tomó el micelio del hongo con el uso de un asa. Luego, se transfirió el micelio obtenido al tubo y se repite el proceso según las características morfológicas del hongo o bacteria. A continuación, se mezcló con un vortex procurando tener una mezcla homogénea (aproximadamente 1 minuto), y se incubó la suspensión en un termobloque a una temperatura de 100 °C durante 5 minutos. De manera inmediata, se pasó a un bloque frío para que se produzca un shock térmico durante 30 segundos. Posteriormente, se centrifugó la suspensión a 15,000 rpm durante 5 minutos a una temperatura de 4°C, y se transfirió 200 µl de sobrenadante a un tubo estéril, manteniéndolo a una temperatura de -4 °C. Finalmente, se realizó la cuantificación de ADN mediante Nanodrop [25]. El proceso de extracción de ADN de bacterias se realizó de manera similar, en este caso se toma una colonia de las bacterias tomando en cuenta la textura de estas, para que el proceso de extracción de ADN sea más efectivo.

Amplificación por PCR y Secuenciación

Un total de 30 muestras de ADN de hongos y 25 muestras de ADN de bacterias fueron enviadas para el respectivo proceso de aplicación por PCR y secuenciación correspondientes a Macrogen en Corea. Los primers designados para este proceso fueron 16S en el caso de las bacterias Primer 16S-F 5'-GGAGGACAGCCGTA GATA-3', y los correspondientes a la región del espaciador interno transcrito (ITS) para los hongos TS5-1737FGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG [26].

Revisión bibliográfica del potencial biorremediador de hongos y bacterias

La metodología de revisión bibliográfica se empleó para determinar cuáles de los microorganismos identificados tienen aplicaciones potenciales en el campo de la biorremediación, cumpliendo con el objetivo de esta investigación. Para llevar a cabo esta revisión, se recopiló información de diversas fuentes bibliográficas relevantes, incluyendo artículos de revistas científicas.

La revisión comenzó con la identificación molecular de los hongos y bacterias aislados. Posteriormente, se realizó una búsqueda exhaustiva en bases de datos especializadas como el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Las palabras clave utilizadas en esta búsqueda incluyeron "biorremediación", "microorganismos", "hongos", "bacterias", "degradación de contaminantes", "aplicaciones". La información se buscó en estudios y artículos publicados hasta el año 2024 para asegurar la inclusión de datos recientes y relevantes [27].

Análisis estadístico

Para analizar la diversidad microbiana, primero se calcularon los índices de diversidad de Shannon para cada combinación de punto de muestreo y profundidad a partir de tres repeticiones por cada punto y profundidad. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existen diferencias significativas en estos índices por punto de muestreo [28]. Se realizó un análisis de varianza para determinar las diferencias significativas entre riqueza de especies y por punto de muestreo y profundidad en el programa Rstudio

Referencias Bibliográficas

1. Mulenga M, Ouma KO, Monde C, Syampungani S. Aquatic Mercury Pollution from Artisanal and Small-Scale Gold Mining in Sub-Saharan Africa: Status, Impacts, and Interventions. *Water*. 2024;16: 756.
2. Zeglin LH. Stream microbial diversity in response to environmental changes: review and synthesis of existing research. *Front Microbiol*. 2015;6: 128252.
3. Li J, Zhai Y, Ge G, Xu Y, Wang C, Hu A, et al. Bacterial Community Composition and Function of Tropical River Ecosystem along the Nandu River on Hainan Island, China. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;20. doi:10.3390/ijerph20010382
4. Mestanza-Ramón C, Cuenca-Cumbicus J, D'Orío G, Flores-Toala J, Segovia-Cáceres S, Bonilla-Bonilla A, et al. Gold Mining in the Amazon Region of Ecuador: History and a Review of Its Socio-Environmental Impacts. *Land*. 2022;11: 221.
5. Ali B, Khan A, Ali SS, Khan H, Alam M, Ali A, et al. Heavy Metals and Microbial Diversity: A Comparative Analysis of Rivers Swat and Kabul. *Water*. 2023;15: 3297.
6. Panizzon JP, Pilz Júnior HL, Knaak N, Ramos RC, Ziegler DR, Fiuza LM. Microbial Diversity: Relevance and Relationship Between Environmental Conservation and Human Health. *Braz Arch Biol Technol*. 2015;58: 137–145.
7. Tyagi I, Kumar V, Karri RR. Environmental Metagenomics, Water Quality and Suggested Remediation Measures of Polluted Waters: A Combined Approach. Elsevier; 2024.
8. Santiago BCF, de Souza ID, Cavalcante JVF, Morais DAA, da Silva MB, Pasquali MA de B, et al. Metagenomic Analyses Reveal the Influence of Depth Layers on Marine Biodiversity on Tropical and Subtropical Regions. *Microorganismos*. 2023;11: 1668.
9. Awasthi KK, Sankhla MS, Lukose S, Parihar K. Friction Ridge Analysis: Applications of Nanoparticles for Latent Fingerprint Development. Springer Nature; 2023.
10. Xu X, Xia L, Zhu W, Zhang Z, Huang Q, Chen W. Role of *Penicillium chrysogenum* XJ-1 in the Detoxification and Bioremediation of Cadmium. *Front Microbiol*. 2015;6: 172278.
11. Andreolli M, Lampis S, Brignoli P, Vallini G. *Trichoderma longibrachiatum* Evx1 is a fungal biocatalyst suitable for the remediation of soils contaminated with diesel fuel and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2016;23: 9134–9143.
12. Kumar P, Chaudhary V, van Hullebusch ED, Busquets R, Srivastav AL. Bioremediation of Emerging Contaminants from Soils: Soil Health Conservation for Improved Ecology and Food Security. Elsevier; 2024.
13. Suhara H, Kamei I, Maekawa N, Kondo R. Biotransformation of polychlorinated dibenzo-p-dioxin by *Coprinellus* species. *Mycoscience*. 2011;52: 48–52.
14. Bharagava RN, Mishra S. Hexavalent chromium reduction potential of *Cellulosimicrobium* sp. isolated from common effluent treatment plant of tannery industries. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2018;147:

102–109.

15. Xu X, Xia L, Zhu W, Zhang Z, Huang Q, Chen W. Role of *Penicillium chrysogenum* XJ-1 in the Detoxification and Bioremediation of Cadmium. *Front Microbiol.* 2015;6: 172278.
16. Bodor A, Bounedjoum N, Feigl G, Duzs Á, Laczi K, Szilágyi Á, et al. Exploitation of extracellular organic matter from *Micrococcus luteus* to enhance ex situ bioremediation of soils polluted with used lubricants. *J Hazard Mater.* 2021;417: 125996.
17. D Alsukaibi AK, Mechi L, Alimi FR, A Alshamari AKA, Alshammari EM, Ahmed A O, et al. Bioremediation potential of strain isolated from the Ha'il region of Saudi Arabia. *Bioinformation.* 2023;19: 901–907.
18. Kumar R, Chaudhry V, Prakash O. Multi-omics Profiling of Unique Niches to Reveal the Microbial and Metabolite Composition. *Frontiers Media SA*; 2022.
19. Ortiz-Vera MP, Olchanheski LR, da Silva EG, de Lima FR, Martinez LR del PR, Sato MIZ, et al. Influence of water quality on diversity and composition of fungal communities in a tropical river. *Sci Rep.* 2018;8: 1–9.
20. Li C, Quan Q, Gan Y, Dong J, Fang J, Wang L, et al. Effects of heavy metals on microbial communities in sediments and establishment of bioindicators based on microbial taxa and function for environmental monitoring and management. *Sci Total Environ.* 2020;749: 141555.
21. Gupta A. Heavy Metal and Metalloid Contamination of Surface and Underground Water: Environmental, Policy and Ethical Issues. CRC Press; 2020.
22. Custodio M, Espinoza C, Peñaloza R, Peralta-Ortiz T, Sánchez-Suárez H, Ordinola-Zapata A, et al. Microbial diversity in intensively farmed lake sediment contaminated by heavy metals and identification of microbial taxa bioindicators of environmental quality. *Sci Rep.* 2022;12: 80.
23. Maran NH, Crispim B do A, Iahnn SR, Araújo RP de, Grisolia AB, Oliveira KMP de. Depth and Well Type Related to Groundwater Microbiological Contamination. *Int J Environ Res Public Health.* 2016;13. doi:10.3390/ijerph13101036
24. NTE INEN 2169: Agua. Calidad del agua. Muestreo. Manejo y conservación de muestras: Instituto Ecuatoriano de Normalización (INEN) : Free Download, Borrow, and Streaming : In: Internet Archive [Internet]. [cited 24 Apr 2024].
25. Hamer M, Saraullo V, Brihuega B, Watanabe O, Martinez M, Grune Löffler S. Comparación de métodos de extracción de ADN simples y económicos para el diagnóstico molecular de leptospirosis animal. *FAVE Secc Cienc Vet.* 2019; 68–73.
26. Galliano I, Daprà V, Zaniol E, Alliaudi C, Graziano E, Montanari P, et al. Comparison of methods for isolating fungal DNA. *Practical Laboratory Medicine.* 2021;25. doi:10.1016/j.plabm.2021.e00221
27. Bioremediation potential of novel fungal species isolated from wastewater for the removal of lead from liquid medium. *Environmental Technology & Innovation.* 2020;18: 100757.
28. Khalmuratova I, Choi D-H, Woo J-R, Jeong M-J, Oh Y, Kim Y-G, et al. Diversity and Plant Growth-Promoting Effects of Fungal Endophytes Isolated from Salt-Tolerant Plants. *J Microbiol Biotechnol.*

ANEXOS

Anexo 1: Permiso de acceso a recursos genéticos.



CONTRATO MARCO DE ACCESO A LOS RECURSOS GENÉTICOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DENOMINADO: "IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LA DIVERSIDAD DE BACTERIAS Y HONGOS Y SUS POTENCIALIDADES PARA LA BIORREMEDIACIÓN DE METALES PESADOS PRODUCTO DE LA MINERÍA Y BIOCONTROL DE PLAGAS DE CULTIVOS AMAZÓNICOS EN LA PROVINCIA DE NAPO" CELEBRADO ENTRE EL MINISTERIO DEL AMBIENTE, AGUA Y TRANSICIÓN ECOLÓGICA, A TRAVÉS DE LA SUBSECRETARÍA DE PATRIMONIO NATURAL; Y, LA UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM

MAATE-DBI-CM-2023-0308

COMPARECIENTES:

A la suscripción del presente **Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos** comparecen, por una parte el **MINISTERIO DEL AMBIENTE, AGUA Y TRANSICIÓN ECOLÓGICA**, a través de la Subsecretaría de Patrimonio Natural, legalmente representado por el Lcdo. **LUIS RAFAEL CUMBA ENDARA** en su calidad de Subsecretario de Patrimonio Natural, conforme Acción de Personal Nro. 0731 de 24 de Mayo de 2023, y delegación contenida en el Acuerdo Ministerial Nro. MAAE-2020-24 de 31 de agosto de 2020, a quien en adelante se le denominará **"MAATE"**; y, por otra parte, la **UNIVERSIDAD REGIONAL AMAZÓNICA IKIAM**, representada por la Mgs. **SILVIA ALEJANDRA LLENERA GORDILLO**, quién actúa en ejercicio de la delegación otorgada por la Rectora de la Universidad Regional Amazónica IKIAM, Sra. María Victoria Reyes Vargas PhD, conforme Memorando Nro. IKIAM-DR-2023-1143-ME de 3 de Julio de 2023, que se agrega como documento habilitante y a quien en adelante se le denominará **"IKIAM"**.

Las partes convienen en celebrar, el presente **Contrato Marco de Acceso a los Recursos Genéticos** respecto de la solicitud del proyecto de investigación científica denominado: **"IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LA DIVERSIDAD DE BACTERIAS Y HONGOS Y SUS POTENCIALIDADES PARA LA BIORREMEDIACIÓN DE METALES PESADOS PRODUCTO DE LA MINERÍA Y BIOCONTROL DE PLAGAS DE CULTIVOS AMAZÓNICOS EN LA PROVINCIA DE NAPO"**, contenido y estipulado en las siguientes cláusulas:

PRIMERA. ANTECEDENTES.-

1. El numeral 7, del artículo 3 de la Constitución de la República del Ecuador establece que son deberes primordiales del Estado: "(...)7. *Proteger el patrimonio natural y cultural del país. (...)*".
2. El artículo 14 de la Constitución de la República del Ecuador, determina que: "...Se reconoce el derecho de la población a vivir en un ambiente sano y ecológicamente equilibrado, que garantice la sostenibilidad y el buen vivir, *sumak kawsay*. **Se declara de interés público la preservación del ambiente, la conservación de los ecosistemas, la biodiversidad y la integridad del patrimonio genético del país, la prevención del daño ambiental y la recuperación de los espacios naturales degradados...**" (lo destacado en

Ministerio del Ambiente, Agua y Transición Ecológica
Dirección: Calle Madrid 1159 y Andalucía
Código postal: 170525 / Quito-Ecuador
Teléfono: +593-2 398 7600
www.ambiente.gob.ec



1 / 22

CERT #s 5524.01 & 5524.02

INF.LASA-10-06-24 -5902
ORDEN DE TRABAJO No. 24-355M

ANÁLISIS FÍSICO - QUÍMICO

ITEM	PARÁMETROS	UNIDADES	RESULTADOS	INCERTIDUMBRE U' (k=2)	MÉTODO DE ENSAYO
1	ALUMINIO ^(a)	mg/l	<0.080	± 5,80 %	PEE-LASA-INS-09 EPA 6020B, APHA 3125
2	ANTIMONIO ^(a)	mg/l	<0.002	± 5,14 %	PEE-LASA-INS-09 EPA 6020B, APHA 3125
3	ARSENICO ^(a)	mg/l	0.00277	± 10,32 %	PEE-LASA-INS-09 EPA 6020B, APHA 3125
4	BARIO ^(a)	mg/l	0.0484	± 7,37 %	PEE-LASA-INS-09 EPA 6020B, APHA 3125
5	BERILIO ^(a)	mg/l	<0.002	± 7,34 %	PEE-LASA-INS-09 EPA 6020B, APHA 3125
6	BORO ^(a)	mg/l	<0.160	± 13,77 %	PEE-LASA-INS-09 EPA 6020B, APHA 3125
7	CADMIO ^(a)	mg/l	<0.002	± 19,68 %	PEE-LASA-INS-09 EPA 6020B, APHA 3125
8	CALCIO ^(a)	mg/l	43,8	± 9,94 %	PEE-LASA-INS-09 EPA 6020B, APHA 3125
9	COBALTO ^(a)	mg/l	<0.002	± 7,35 %	PEE-LASA-INS-09 EPA 6020B, APHA 3125
10	COBRE ^(a)	mg/l	<0.012	± 8,23 %	PEE-LASA-INS-09 EPA 6020B, APHA 3125
11	CROMO ^(a)	mg/l	<0.002	± 8,56 %	PEE-LASA-INS-09 EPA 6020B, APHA 3125
12	ESTAÑO ^(a)	mg/l	<0.002	± 10,75 %	PEE-LASA-INS-09 EPA 6020B, APHA 3125
13	ESTRONCIO ^(a)	mg/l	0.178	± 9,32 %	PEE-LASA-INS-09 EPA 6020B, APHA 3125
14	HERRO ^(a)	mg/l	<0.080	± 11,63 %	PEE-LASA-INS-09 EPA 6020B, APHA 3125
15	LITIO ^(a)	mg/l	0.00238	± 9,81 %	PEE-LASA-INS-09 EPA 6020B, APHA 3125
16	MAGNESIO ^(a)	mg/l	5,14	± 8,04 %	PEE-LASA-INS-09 EPA 6020B, APHA 3125
17	MANGANESEO ^(a)	mg/l	<0.002	± 6,42 %	PEE-LASA-INS-09 EPA 6020B, APHA 3125
18	MERCURIO ^(a)	mg/l	<0.002	± 13,48 %	PEE-LASA-INS-09 EPA 6020B, APHA 3125
19	MOLIBDENO ^(a)	mg/l	0.0147	± 7,08 %	PEE-LASA-INS-09 EPA 6020B, APHA 3125
20	NIQUEL ^(a)	mg/l	<0.002	± 21,81 %	PEE-LASA-INS-09 EPA 6020B, APHA 3125
21	PLATA ^(a)	mg/l	<0.002	± 10,19 %	PEE-LASA-INS-09 EPA 6020B, APHA 3125

El parámetro marcado con (a) ESTÁ incluido en el alcance de acreditación de ATLA.

¹¹² Valores de referencia tomados del Acuerdo Ministerial N° 097, Libro VI de la Calidad Ambiental, Tabla 1: Criterios de calidad de fuentes de agua para consumo humano y doméstico.

James H. D.

M.Sc. Giovanni Jibaja
ASISTENTE TÉCNICO

Elaborado por: Giovanni Iñaba

Prohibida la reproducción parcial por cualquier medio sin permiso por escrito del laboratorio.

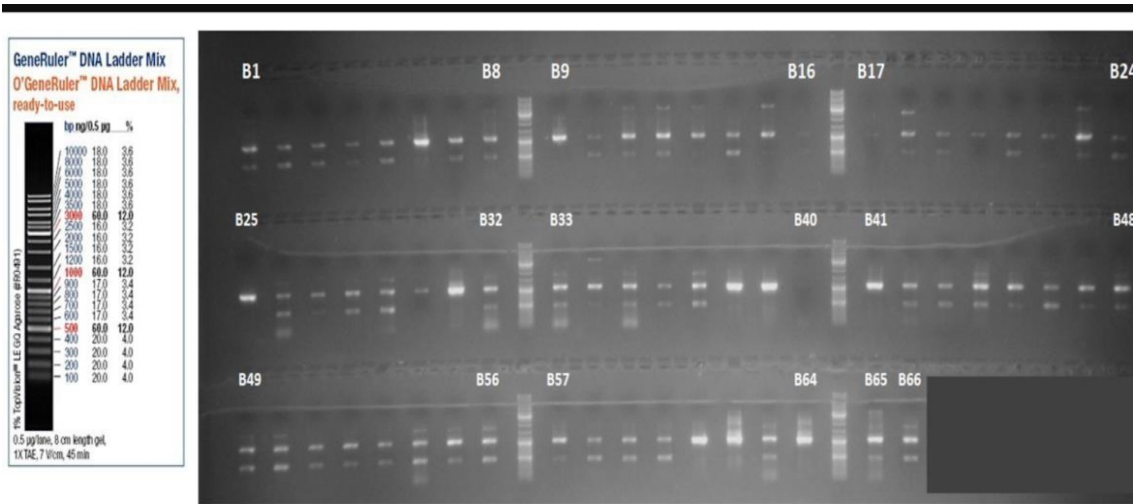
Prohibida la reproducción parcial por cualquier medio sin permiso por escrito del laboratorio.

La responsabilidad exclusivamente del resultado correspondiente a la muestra sometida a ensayo y que ha sido recibida en el laboratorio, por el contrario, no se responsabiliza de la información proporcionada por el cliente asociada a la muestra, así como sus datos descriptivos.

El laboratorio se compromete con la Imparcialidad y Confidencialidad de la información y los resultados (la aceptación de este informe implica la aceptación de la política relativa al tema y declarada en www.laboratoriodelos.com).

Los criterios de conformidad serán emitidos solamente si el cliente lo solicita por escrito.

Anexo 3: Imagen de gel de muestras de bacterias desde la muestra B41-B65.



Anexo 4: Imagen de gel de muestras de hongos desde la muestra H20-H50.

