



ANEXO 1

FORMATO PARA LA PRESENTACIÓN DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN CON EL
FINANCIAMIENTO DEL FEDU

1. Título del proyecto

Caracterización molecular de bacterias nativas resistentes a mercurio aislados en relaves de la mina La Rinconada y su relevancia en salud pública

2. Área de Investigación

Área de investigación	Línea de Investigación	Disciplina OCDE
CIENCIAS BIOMÉDICAS	DIAGNÓSTICO Y EPIDEMIOLOGÍA	BIOLOGÍA

3. Duración del proyecto (meses)

10 meses

4. Tipo de proyecto

Individual	<input type="radio"/>
Multidisciplinario	<input checked="" type="radio"/>
Director de tesis pregrado	<input type="radio"/>

4. Datos de los integrantes del proyecto

Apellidos y Nombres	GONZALES ALCOS, VICKY CRISTINA
Escuela Profesional	BIOLOGÍA
Celular	996003547
Correo Electrónico	vcgonzales@unap.edu.pe

Apellidos y Nombres	TRIGOS RONDÓN CIRIA IVONNE
Escuela Profesional	BIOLOGÍA
Celular	951818983
Correo Electrónico	ctrigos@unap.edu.pe

Apellidos y Nombres	CERVANTES ALAGON SHEYLA
Escuela Profesional	ODONTOLOGIA
Celular	951775222
Correo Electrónico	slcervantes@unap.edu.pe

Apellidos y Nombres	NINA CARITA LUCRECIA
Escuela Profesional	CIENCIAS SOCIALES
Celular	951595599
Correo Electrónico	lucrecia@unap.edu.pe



Apellidos y Nombres	HUARACHI VALENCIA, JUAN PABLO
Escuela Profesional	BIOLOGÍA
Celular	968437708
Correo Electrónico	jhuarachi@unap.edu.pe

I. Título

Caracterización molecular de bacterias nativas resistentes a mercurio aislados en relaves de la mina La Rinconada y su relevancia en salud pública

II. Resumen del Proyecto de Tesis (Debe ser suficientemente informativo, presentando - igual que un trabajo científico- una descripción de los principales puntos que se abordarán, objetivos, metodología y resultados que se esperan)

El presente proyecto tiene como objetivo caracterizar a nivel molecular bacterias nativas resistentes a mercurio aislados en relaves de la mina La Rinconada y su relevancia en salud pública ; La metodología para Identificar a nivel molecular bacterias nativas resistentes a mercurio en relaves de la mina Rinconada y su posición filogenética se aplicara la actividad según protocolos del Instituto nacional de salud, el Minam y estándares internacionales, para identificarlas biomolecularmente se aplicara las técnicas de la proteína de la cadena polimerasas ,y para determinar la resistencia de bacterias nativas aisladas de relave minero al mercurio en condiciones in vitro, se aplicara la técnica de identificación microscopia y bioquímica ,según los estándares del INS actualizado y finalmente la aplicación de un instrumento para la observación y encuesta ,validad. ,el método estadístico para .Los resultados que se desea obtener es demostrar que si existen bacterias nativas resistentes a mercurio y es muy importante valorar y resolver el problema de salud publica en La mina la rinconada.

III. Palabras claves (Keywords) (Colocadas en orden de importancia. Máx. palabras: cinco)

Bacterias, mercurio, relave, mina, salud pública

IV. Justificación del proyecto

El mercurio (Hg) ambiental existe en su forma elemental, así como de mercurio inorgánico y mercurio orgánico. En su forma elemental, el Hg existe como metal líquido, que a pesar de su baja presión de vapor ($2 \mu\text{m Hg}$), puede convertirse en vapor a temperatura ambiente debido a su bajo calor latente de evaporación (295 kJ/kg) y su relativa ausencia en el aire. Los vapores tóxicos formados por la vaporización del Hg o la quema de materiales que contienen Hg pueden ingresar al sistema respiratorio y pasar fácilmente a la circulación. La vida media biológica promedio del Hg inhalado en todo el cuerpo es de ~60 días. Debido a que el vapor de Hg puede volverse soluble en lípidos una vez oxidado, existe el potencial de bioacumulación en la corteza renal, hígado y especialmente el cerebro, donde la vida media del Hg puede ser de hasta 20 años (Rice et al., 2014).

Asimismo, las actividades humanas casi han triplicado la cantidad de mercurio en la atmósfera y la carga atmosférica está aumentando un 1,5 por ciento por año (Clifton, 2007). El suelo contaminado por mercurio o la redistribución de agua contaminada tiene el potencial de entrar en la cadena alimentaria a través de las plantas y el ganado. Una vez en la cadena alimentaria, el mercurio puede bioacumularse y causar efectos adversos para la salud humana (Rice et al., 2014).

La Rinconada es un centro poblado ubicado en La Ananea, Puno, a 5000 msnm, se calcula que en este centro poblado viven 30 mil habitantes, cuya actividad económica se centra en la minería en el Cerro Ananea. La explotación de Ananea está concesionada a la Corporación Minera Ananea, que alquila la explotación de cada socavón a más de 400



operadores mineros o contratistas. En este esquema laboral, el sistema de pago se denomina cachorro: los mineros trabajan 25 días sin paga, y los otros 5 días de trabajo se llevan el fruto de su trabajo para beneficio propio. Para volver la situación aún más crítica, el centro poblado convive con múltiples formas de criminalidad, y carece por completo de servicios básicos de saneamiento, además que el 93% no cuenta con equipos de protección personal para manipular este metal (León, 2022).

De otro lado, en hábitats contaminados con Hg, la actividad microbiana es el principal mecanismo de especiación de Hg, aunque el Hg también puede ser tóxico para la misma comunidad microbiana. Los iones de Hg pueden interactuar fácilmente con los ligandos de sulfhidrilo en las proteínas, lo que da como resultado la inactivación de las proteínas y la pérdida de las funciones celulares (Dash & Das, 2012). Además, los compuestos orgánicos de Hg como el MeHg pueden reaccionar con el ADN causando daños irreversibles (Mathema et al., 2011). Algunos microorganismos han desarrollado formas de desintoxicación de Hg que involucran genes específicos relacionados con la tolerancia y la resistencia. Por lo general, la resistencia está relacionada con los genes de respuesta activa de Hg para la reducción enzimática de Hg^{2+} a Hg^0 o la metilación a MeHg, así como la desmetilación antes de la reducción (Das et al., 2016). Por el contrario, la tolerancia implica una respuesta metabólica general normalmente relacionada con la unión del Hg a los constituyentes de la pared celular, los pigmentos y los polisacáridos extracelulares (biosorción) y la precipitación de complejos inorgánicos de Hg, como el HgS, alrededor de las células (Gadd, 2010).

Así, las bacterias resistentes al Hg son responsables de las tres transformaciones biológicas principales del Hg: la reducción del Hg^{2+} a Hg^0 , la metilación del Hg^{2+} a MeHg y la desmetilación del MeHg. El primer y último proceso están vinculados a genes en el operón *mer*, ampliamente distribuido entre bacterias y arqueas, que incluye los genes para el transporte y la movilización de Hg (*mer P/mer T/mer C*), *merAB* para la desmetilación y reducción de Hg y *merR/merD* para detección y regulación (Barkay et al. 2003). Por otra parte, la metilación está asociada a procesos anóxicos relacionados con bacterias sulfato-reductoras y ferro-reductoras y metanógenos.

Es por tal motivo que se propone la caracterización de bacterias resistentes al mercurio en relaves mineros de la mina Rinconada y su importancia en la salud pública.

V. Antecedentes del proyecto

Según Fernández (2022) en Secocha, Arequipa, través de un análisis de ADN (99,78% de similitud) y espectrometría de absorción atómica, la bacteria Gram-positiva *Zhihengliuella albasp.* T2.2 fue identificada como la cepa con mayor capacidad de remoción de mercurio de las soluciones de cultivo con una concentración inicial de mercurio de $162 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. La capacidad de eliminación alcanzó valores cercanos al 39,5% en un tiempo de incubación de 45 días, con máxima eficacia de eliminación en las primeras 48 h.

Cardona et al. (2022) en la selva amazónica en Colombia, encontraron que la mayoría de las cepas bacterianas altamente resistentes ($MIC > 40 \text{ mg L}^{-1} \text{ HgCl}_2$) se aislaron de muestras de suelo y sedimento las que pertenecían a *Pseudomonas* (60 %) o *Bacillus* (20%). Asimismo, las cepas bacterianas altamente resistentes fueron positivas para la presencia del gen *merA*, lo que sugiere un mecanismo activo de resistencia al mercurio, como ocurre con las cepas de *Pseudomonas* sp. TP30 y *Burkholderia contaminans* TR100 ($MIC = 64$ y $71 \text{ mg L}^{-1} \text{ HgCl}_2$, respectivamente), que en presencia de concentraciones crecientes de mercurio expresaron el gen *merA* a niveles crecientes, concomitante con una actividad significativa de reducción de mercurio, lo que sugiere una alta conservación de genes dentro de los grupos taxonómicos, pero también varios eventos de transferencia horizontal de genes entre géneros taxonómicamente distantes.

De otro lado en Indonesia, Irawati et al. (2012) reveló que la adición de 50 y 100 ppm de $HgCl_2$ en *Brevundimonas* sp. HgP1 resultó en la disminución de la tasa de crecimiento y el alargamiento de la fase de latencia en 8 y 16 horas, respectivamente. La adición de $HgCl_2$ también afectó el aspecto morfológico de la colonia bacteriana a negro. *Brevundimonas* sp. HgP1 acumuló Hg^{2+} hasta 1,09 y 2,7 mg/g de peso seco de células y eliminó 64,38 y 57,10 % de Hg^{2+} del medio que contenía 50 y 100 ppm de $HgCl_2$, respectivamente.

En Australia a partir de suelos contaminados, Mahbub et al. (2016) aisló una cepa bacteriana resistente al mercurio, SA2, del suelo contaminado con mercurio. La secuencia del gen 16S



rRNA de este aislado mostró una similitud de secuencia del 99% con los géneros *Sphingobium* y *Sphingomonas* del grupo α -proteobacteria. Sin embargo, el aislado formó una línea filética distinta con el género *Sphingobium*, lo que sugiere que la cepa pertenece a *Sphingobium* sp. Los estudios de toxicidad indicaron resistencia a niveles altos de mercurio con valores de EC 50 estimados de 4,5 mg L⁻¹ y 44,15 mg L⁻¹ y valores de CIM de 5,1 mg L⁻¹ y 48,48 mg L⁻¹ en minimal y rich media, respectivamente. La cepa SA2 pudo volatilizar el mercurio mediante la producción de la enzima reductasa de mercurio, lo que la convierte en una candidata potencial para remediar el mercurio.

VI. Hipótesis del trabajo

Es probable que exista bacterias nativas resistentes a mercurio aislados en relaves de la mina La Rinconada y valorar su relevancia en salud pública

VII. Objetivo general

Caracterizar a nivel molecular bacterias nativas resistentes a mercurio aislados en relaves de la mina La Rinconada y su relevancia en salud pública

VIII. Objetivos específicos

- Identificar a nivel molecular bacterias nativas resistentes a mercurio en relaves de la mina Rinconada y su posición filogenética
- Determinar la resistencia de bacterias nativas aisladas de relave minero al mercurio en condiciones in vitro
- Evaluar las consecuencias en salud de la población que vive en la Rinconada

IX. Metodología de investigación

Área de estudio

Distrito de Ananea, provincia de Sandía, a ~5200 msnm a una Longitud 69°26'00"W y Latitud 14°37'00"S, donde el yacimiento cuenta con 44 mantos y su reserva en mineral potencial es de 2,24 Mt con 14,53 g/t (Acosta et al., 2011).

Las muestras serán recolectadas con draga metálica Van ven a 20 cm de profundidad en los relaves de la mina la rinconada en 5 puntos se tomara un litro en un frasco , se utilizara agua peptonada al 10% % como medio de transporte. Las muestras serán conservadas en cadena de frio hasta laboratorio. La identificación bacteriana se realizara a partir de (tripticasa soja agar) TSA posteriormente incubados a 37°C durante 24 a 48 horas.

Transcurrido el tiempo de incubación serán trasladados a los medios selectivos -S-S (Salmonella-Shigella), -TCBS (Vibrios), -Mac Conkey- EMB (Enterobacterias), Baird- Parker (Cocos gram positivos) incubadas a 37°C durante 24-48 horas y finalmente trasladadas a medio LB (Luria Bertani) para posteriores ensayos.

La identificación microscópica y bioquímica

La actividad metabólica de las bacterias será determinada por el sistema de BBL Crystal™ Kit ID para bacterias Gram negativas no fermentadoras y Gram positivas, siguiendo las indicaciones de la casa comercial y Mostafa et al., 2011; INS -Lima.

Caracterización molecular

Las colonias aisladas de la cepa resistente a mercurio serán cultivadas en agar TCBS por 24 h a 37°C. De este nuevo cultivo se tomaran con aza aproximadamente 0.25 g de las colonias más aisladas y se realizaran la extracción del ADN utilizando el kit de extracción DNeasy Powers oil® de QIAGEN. El gen 16S ARNr de la extracción será amplificada con los procedimientos estándar de PCR ,los cuales serán llevados al Instituto Nacional de salud Lima. Las secuencias serán analizadas con el programa 4Peaks y posteriormente comparadas con la base de datos genómica del INS.

Determinación de la resistencia de las bacterias aisladas en los relaves de la mina la rinconada

Identificación microscópica y bioquímica.

Las colonias axénicas de 24 horas de incubación serán suspendidas en caldo LB a 0.5 en la escala de Mac Farland; luego, con un hisopo previamente estéril, la suspensión será por



siembra masiva en caldo LB Hinton con diferentes concentraciones de mercurio (10 ppm, 15 ppm, 20 ppm, 30ppm, 45 ppm, 60 ppm, 75 ppm, 90 ppm, 105 ppm, 120 ppm, 135 ppm, 150 ppm y 180 ppm); posteriormente, se identificaron como bacterias resistentes a mercurio, aquellas que presenten turbidez a las 24 horas de inoculada en el caldo LB con las diferentes concentraciones de Mercurio; luego de esto se sembraron en Agar LB para descripción de colonias y realización de tinción de Gram para confirmar la pureza de la cepa. Y para evaluar las consecuencias de salud en la población que vive en La Rinconada se aplicara una ficha de observación y encuesta .

X. Referencias (Listar las citas bibliográficas con el estilo adecuado a su especialidad)

- Acosta, J., Rodríguez, I., Valencia, M., & Flores, A. (2011). Memoria sobre la geología económica de la región Puno. INGENMET. http://siar.minam.gob.pe/puno/sites/default/files/archivos/public/docs/2011_ge33_memoria_geologia_economica_puno.pdf
- Cardona, G. I., Escobar, M. C., Acosta-González, A., Marín, P., & Marqués, S. (2022). Highly mercury-resistant strains from different Colombian Amazon ecosystems affected by artisanal gold mining activities. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(7), 2775–2793. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11860-y>
- Clifton, J. C. (2007). Mercury Exposure and Public Health. *Pediatric Clinics of North America*, 54(2), 237.e1-237.e45. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.pcl.2007.02.005>
- Das, S., Dash, H. R., & Chakraborty, J. (2016). Genetic basis and importance of metal resistant genes in bacteria for bioremediation of contaminated environments with toxic metal pollutants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(7), 2967–2984. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7364-4>
- Dash, H. R., & Das, S. (2012). Bioremediation of mercury and the importance of bacterial mer genes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 75, 207–213. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2012.07.023>
- Fernandez-F, F., Lopez-C, P., Febres-Molina, C., Gamero-Begazo, P. L., Gómez, B., Bernabe-Ortiz, J. C., Cáceres-Huambo, A., & Aguilar-Pineda, J. A. (2022). Identification and Characterization of Peruvian Native Bacterial Strains as Bioremediation of Hg-Polluted Water and Soils Due to Artisanal and Small-Scale Gold Mining in the Secocha Annex, Arequipa. In *Sustainability* (Vol. 14, Issue 5). <https://doi.org/10.3390/su14052669>
- Gadd, G. M. (2010). Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology*, 156(3), 609–643. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/mic.0.037143-0>
- Irawati, W., Soraya, P., Baskoro, Y., & Abyatar, H. (2012). A Study on Mercury-Resistant Bacteria Isolated from a Gold Mine in Pongkor Village, Bogor, Indonesia. *HAYATI Journal of Biosciences*, 19(4), 197–200. <https://doi.org/https://doi.org/10.4308/hjb.19.4.197>
- León, L. (2022). El derecho del trabajo y la seguridad social en época de cambios. *Gaceta Jurídica SA*. <https://bibliotecadigital.gacetajuridica.com.pe/info/el-derecho-del-trabajo-y-la-seguridad-social-en-epoca-de-cambios-01112794?locale=es>
- Mahbub, K. R., Krishnan, K., Megharaj, M., & Naidu, R. (2016). Bioremediation potential of a highly mercury resistant bacterial strain *Sphingobium* SA2 isolated from contaminated soil. *Chemosphere*, 144, 330–337. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.061>
- Mathema, V. B., Thakuri, B. C., & Sillanpää, M. (2011). Bacterial mer operon-mediated detoxification of mercurial compounds: a short review. *Archives of Microbiology*, 193(12), 837–844. <https://doi.org/10.1007/s00203-011-0751-4>
- Rice, K. M., Walker, E. M., Wu, M., Gillette, C., & Blough, E. R. (2014). Environmental Mercury and Its Toxic Effects. *J Prev Med Public Health*, 47(2), 74–83. <https://doi.org/10.3961/jpmph.2014.47.2.74>



XI. Uso de los resultados y contribuciones del proyecto (Señalar el posible uso de los resultados y la contribución de los mismos)

Los resultados serán de mucha utilidad primeramente por que se concera que bacterias resistentes al mercurio existe en la zona de La Rinconada, lo cual por su producciones de minerales como es el oro la plata y otros, también se encuentran como contaminantes al medio ambiente produciendo impacto negativo como también a la salud huaman y de los demás seres vivos, los cuales ni siquiera se perctan sobre las consecuencias que produce el encontrarse viviendo y trabajando en la zona donde nisiquiera hay servicios, asi mismo servirá para saber en que medida estas bacterias han adquirido resistencia frente a los antibióticos; finalmente conocer cuales son las consecuencias en cuanto refiere a salud en la poblacion ,debido a que trabaja toda la familia, padre, madre hijos .

XII. Impactos esperados

i. Impactos en Ciencia y Tecnología

Impacto positivo en el campo ambiental

ii. Impactos económicos

El impacto a producir es reducir el costo económico en cuanto refiere al tratamiento de enfermedades en la población de La Rinconada, emitir un diagnostico epidemiologico de la situación de los pobladores que viven en un sitio tan contaminado y dar las sugerencias para la salud publica ,la cual estará a cargo la posta de salud que corresponde a la mina y la universidad con apoyo de las facultades correspondientes a fin

iii. Impactos sociales

Respecto al impacto social el centro poblado ha tenido un crecimiento fuertemente acelerado, hacinamiento y condiciones críticas de servicios básicos y consiguientemente limitadas condiciones de vida para la población asentada en la localidad. En este centro poblado hay serios problemas sociales como alcoholismo, delincuencia, violencia callejera y prostitución de mujeres adolescentes en bares y cantinas, es relativamente frecuente la desaparición de personas, violaciones y muerte por asaltos y peleas callejeras y en los bares, los cuales se impondría la educación para la salud y educación para la juventud.

iv. Impactos ambientales

Producira impacto ambiental positivo si ellos reciben educación ambiental después de los resultados obtenidos ,lo cual será realizado por un equipo multidisciplinario ,aplicar diferentes herramientas técnicas para los cambios en el medio ambiente y concientizar al población para un cambio referido al impacto ambiental en forma positiva y también de los mismos generados por la actividad minera en la rinconada.

XIII. Recursos necesarios (Infraestructura, equipos y principales tecnologías en uso relacionadas con la temática del proyecto, señale medios y recursos para realizar el proyecto)



XIV. Localización del proyecto (indicar donde se llevará a cabo el proyecto)

El proyecto se realizara :toma de muestras en los relaves de la mina La rinconada,procesamiento:laboratorio de Biología de la salud y Laboratorio geológico de minas

XV. Cronograma de actividades

XVI. Presupuesto

Descripción	Unidad de medida	Costo Unitario (S/.)	Cantidad	Costo total (S/.)
pasajes			10,000	
analisis			20,000	
Material y equipos			40,000	70,000.00