

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR



Caracterización de comunidades bacterianas y potencial biorremediador de cepas nativas de áreas contaminadas con mercurio, Suyo - Piura.

TESIS

Para optar el grado académico de Maestra en ciencias con

mención en:

Biología Molecular

Autora: Blgo. Rosita Tanyelisbeth Castillo Rogel.

Tumbes, 2020

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO

MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR



**Caracterización de comunidades bacterianas y potencial
biorremediador de cepas nativas de áreas contaminadas con
mercurio, Suyo - Piura.**

Tesis aprobada en forma y estilo por:

Dr. Deza Navarrete, Carlos Alberto (Presidente)

Dr. Niquen Inga, Vicente Lorenzo (Miembro)

PhD. Cedeño Escobar, Virna Alexia (Miembro)

Tumbes, 2020

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

ESCUELA DE POSGRADO MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR



**Caracterización de comunidades bacterianas y potencial
biorremediador de cepas nativas de áreas contaminadas con
mercurio, Suyo - Piura.**

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

Blgo. Castillo Rogel, Rosita Tanyelisbeth (Autora)

PhD. Mialhe Matonnier, Eric Louis D.E. (Asesor)

Tumbes, 2020



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

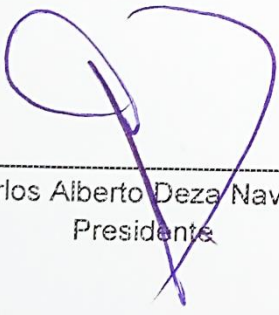
ACTA DE SUSTENTACION DE TESIS

En Tumbes, a los veintisiete días del mes de febrero del año dos mil veinte, a las 15.00 horas, en EL AULA N° 04 DE LA ESCUELA DE POSGRADO DE LA UNTUMBES, se reunieron los miembros del jurado designados con Resolución Directoral N° 023-2019/UNTUMBES-EPG-D; Dr. Carlos Alberto Deza Navarrete - Presidente; Dr. Vicente Lorenzo Niquen Inga - Secretario; Ph.D Virna Alexia Cedeño Escobar - Vocal y con Resolución Directoral N° 036-2020/UNTUMBES-EPG-D, se fijó la fecha de sustentación y defensa de la tesis: Caracterización de comunidades bacterianas y potencial biorremediador de cepas nativas de áreas contaminadas con mercurio, Suyo - Piura, presentada por la estudiante del Programa de Maestría en Ciencias con mención en Biotecnología Molecular Rosita Tanyelizabeth Castillo Rogel, asesorada por el Ph.D. Eric Louis Mialhe Matonnier.

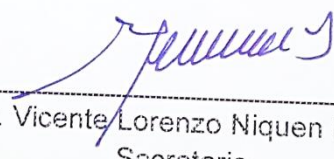
Concluida la exposición y sustentación, absueltas las preguntas y efectuadas las observaciones, lo declaran: SOBRESALIENTE, dando cumplimiento al Art. 29° del Reglamento de Investigación con fines de Graduación en la Escuela de Posgrado de la Universidad Nacional de Tumbes.

Siendo las 15.45 horas, se dio por concluido el acto académico, y dando conformidad se procedió a firmar la presente acta en presencia del público.

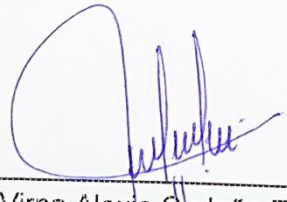
Tumbes, 27 de febrero de 2020.



Dr. Carlos Alberto Deza Navarrete
Presidente



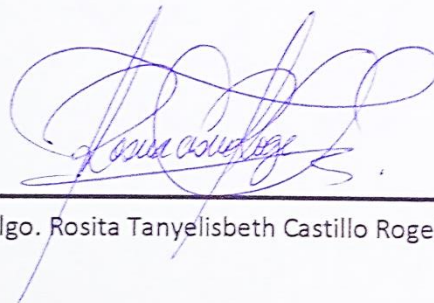
Dr. Vicente Lorenzo Niquen Inga
Secretario



Ph.D Virna Alexia Cedeño Escobar
Vocal

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Yo, Rosita Tanyelisbeth Castillo Rogel, declaro que los resultados reportados en esta tesis son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo, declaro que hasta donde yo sé, no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona excepto, donde se reconoce como tal a través de citas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de esta tesis es producto de mi propio trabajo con la dirección y apoyo de mis asesores de tesis y mi jurado calificador, en cuanto a la concepción y al estilo de la presentación o a la expresión escrita.



Blgo. Rosita Tanyelisbeth Castillo Rogel.

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación está dedicado a mi familia; mis padres Segundo Castillo y Margarita Rogel que han apoyado cada paso que he dado a lo largo de este camino en mi vida profesional y que han llenado mi vida siempre de amor, a mis hermanitos Evan y Jazmin que siempre me tienen presente en sus oraciones y son motivo de alegría en mi vida.

AGRADECIMIENTO

Agradezco infinitamente a Dios, porque es a Él a quien debo este logro, sin Él no hubiera podido cumplir esta meta.

Agradezco también a La Universidad Nacional de Tumbes e Inca Biotec SAC por el apoyo académico y científico que me han brindado; a mis maestros, pilar importante para este programa magistral, gracias por cada clase, cada consejo, cada asesoría y cada llamada de atención que me llevó a mejorar personal y profesionalmente.

A Eric Mialhe, mi asesor, maestro y amigo, gracias por la confianza brindada y la asesoría científica, tienes una gran calidad humana; así mismo a los técnicos de Inca Biotec por la asesoría en las prácticas de laboratorio y en especial a Pedro Masias quien asesoró la parte práctica del componente de análisis proteómico, “Eres un trome Pedrito”.

Así mismo, quiero agradecer a Concytc de Fondecyt por el co-financiamiento de esta maestría, gracias a su programa que apoya a jóvenes científicos peruanos que tenemos ganas de hacer ciencia en el Perú.

A Francis More, por su compañía y apoyo durante todo este tiempo, la asesoría científica, el cariño, el amor y la amistad compartida.

A mis amigos Victor Coba y Meryuri Panta por el apoyo emocional que me brindaron y su compañía para el muestreo, en especial a Victor por lograr ubicar una zona y el permiso para lograr el muestreo. Y por supuesto, a mis amigos de maestría, “Mi grupo 5” por cada uno de los gratos momentos compartidos, por brindarme esa amistad sincera que hoy en día es difícil de encontrar, las tardes y noches de estudio, y cada vez que nos animábamos a continuar en este camino el uno a otro, los quiero mucho, siempre estarán en mi corazón.

RESUMEN

El mercurio (Hg), es uno de los elementos más peligrosos que existen en la tierra, sin embargo, es uno de los metales más empleados en la minería aurífera artesanal sin las medidas de seguridad para su uso y desecho de residuos, causando serios problemas ambientales y de salud humana. En estos ambientes impactados por mercurio residen microorganismos como las bacterias que han desarrollado estrategias para la sobrevivencia en dichas condiciones gracias a la presencia de genes específicos para la conversión de compuestos mercúricos muy tóxicos en menos tóxicos, volatilizarlo y/o bioacumularlo. Por ello, el objetivo de este trabajo fue caracterizar las comunidades bacterianas de zonas impactadas por mercurio y evaluar el potencial de biorremediación de las cepas nativas. En cuanto a la caracterización fue en dos molinos mineros en Suyo-Ayabaca, y una zona cercana (control), en donde se emplea Hg, mediante análisis metagenómico por secuenciamiento de próxima generación dirigido al gen 16S ARNr. Así se encontró al Filo *Proteobacteria* como predominante en las muestras de agua y suelo de los molinos, y a *Actinobacteria* en la muestra control, además de determinar 51 géneros bacterianos comunes entre las muestras de los molinos pudiendo destacar la presencia de *Desulfotomomas*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Shewanella* y *Sphingomonas*. También se aislaron 19 cepas bacterianas resistentes al Hg en medios suplementados con 5 ppm de Hg, de las cuales 7 se seleccionaron para evaluación *in vitro* de: crecimiento hasta en 70 ppm, detección del gen *merA* por PCR de punto final y volatilización, obteniendo los mejores resultados en 5 cepas de los géneros *Lysinibacillus*, *Pseudomonas*, *Citrobacter* y *Enterobacter*, de las cuales por espectrometría de masas MALDI TOF-TOF se detectaron las proteínas codificadas por el operón *mer*. Demostrando así a nivel molecular el potencial con el que cuentan los aislados para su aplicación en biorremediación de mercurio.

Palabras Clave: Biorremediación, MALDI TOF-TOF, Mercurio, Metagenómica, Proteómica.

ABSTRAC

Mercury (Hg), is one of the most dangerous elements that exist on earth, however, it is one of the most used metals in artisanal gold mining without the safety measures for its use and waste disposal, causing serious problems Environmental and human health. In these environments impacted by mercury reside microorganisms such as bacteria that have developed strategies for survival in these conditions thanks to the presence of specific genes for the conversion of very toxic mercury compounds into less toxic, volatilize and / or bioaccumulate it. Therefore, the objective of this work was to characterize the bacterial communities of areas impacted by mercury and evaluate the bioremediation potential of the native strains. As for the characterization, it was in two mining mills in Suyo-Ayabaca, and a nearby area (control), where Hg is used, by metagenomic analysis by next generation sequencing directed to the 16S rRNA gene. Thus, the Phylum Proteobacteria was found as predominant in the water and soil samples of the mills, and Actinobacteria in the control sample, in addition to determining 51 common bacterial genera among the samples of the mills, being able to highlight the presence of *Desulfotomona*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Shewanella* and *Sphingomonas*. 19 Hg-resistant bacterial strains were also isolated in media supplemented with 5 ppm Hg, of which 7 were selected for in vitro evaluation of: growth up to 70 ppm, detection of the *merA* gene by endpoint PCR and volatilization, obtaining the best results in 5 strains of the genera *Lysinibacillus*, *Pseudomonas*, *Citrobacter* and *Enterobacter*, of which the proteins encoded by the mer operon were detected by MALDI TOF-TOF mass spectrometry. Thus demonstrating at the molecular level the potential that the isolates have for their application in mercury bioremediation.

Key Words: Bioremediation, MALDI TOF-TOF, Mercury, Metagenomics, Proteomic.