



**UNIVERSIDAD CENTROAMERICANA**  
**FACULTAD DE CIENCIA, TECNOLOGÍA Y**  
**AMBIENTE**  
**DEPARTAMENTO DE DESARROLLO**  
**TECNOLÓGICO**



**Protocolo de Tesis:**

**“Evaluación del potencial de bio-lixiviación fungal autóctona e inoculada  
de metales en suelos sedimentos contaminados en la  
región minera de Santo Domingo-Chontales”**

Elaborado por:

- ✓ Róger Manuel Midence Díaz.
- ✓ Josué Habbith García Gómez.

Carrera:

- ✓ Ingeniería en Calidad Ambiental

Tutora

- ✓ Dra. Katia Montenegro

09 de Septiembre, 2013

Managua- Nicaragua

## Tabla de Contenido

<b>1. Introducción</b>	<b>3</b>
<b>2. Objetivos</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Objetivo General:</b>	<b>4</b>
<b>2.2. Objetivos Específicos:</b>	<b>4</b>
<b>3. Marco Teórico</b>	<b>5</b>
<b>3.1. Contaminación por actividad minera y su impacto ambiental</b>	<b>5</b>
3.1.1. Subproductos del proceso minero	7
3.1.1.1. Relaves, Colas o Tailings	7
3.1.2. Metales pesados	7
3.1.3. Impacto ambiental a matrices ambientales	8
3.1.3.1. Impacto ambiental al recurso hídrico	9
3.1.3.2. Impacto ambiental a los suelos	9
3.1.3.3. Impacto ambiental a la atmosfera.	10
<b>3.2. Alternativas de remediación de sitios contaminados por metales pesados.</b>	<b>10</b>
<b>3.3. Biolixiviación</b>	<b>11</b>
3.3.1. Mecanismo de Biolixiviación	11
3.3.1.1. Lixiviación heterotrófica (quimio-organotrófica).	12
3.3.1.2. Lixiviación Autotrófica:	12
3.3.2. Microorganismos de lixiviación-Hongos	12
3.3.2.1. Generalidades de los Hongos	13
3.3.2.2. Clasificación	13
3.3.2.3. Importancia de los Hongos	13
3.3.2.4. Interacción entre Microorganismos y Metales	14
3.3.2.5. Ventajas y desventajas de los hongos asociados a la lixiviación.	14
3.3.3. Ácidos Orgánicos	15
3.3.3.1. Ácido Cítrico	15
3.3.3.1.1. Biosíntesis Fúngica del Ácido Cítrico	16
3.3.4. Factores que influyen en Biolixiviación	16
3.3.4.1. Parámetros o condiciones de biolixiviación	16
3.3.4.2. Eficiencia de lixiviación	16
<b>3.4. Identificación genómica de microorganismos</b>	<b>17</b>
3.4.1. Técnica de PCR	17
3.4.2. Estructura del ADN.	17
3.4.3. Extracción y Purificación del ADN provenientes de muestras de suelos.	17
3.4.4. Tratamiento y análisis del ADN purificado.	18
<b>3.5. Área de Estudio</b>	<b>19</b>
3.5.1. Generalidades del sitio	19
3.5.2. Actividad minera en área de estudio	19
3.5.3. Sitios sospechosos de contaminación significativa por Metales pesados	20

<b>4. Diseño metodológico</b>	<b>21</b>
<b>4.1. Tipo de estudio</b>	<b>21</b>
4.1.1. Alcance del problema de investigación:	21
<b>4.2. Área de estudio</b>	<b>22</b>
<b>4.3. Hipótesis y especificación de variables</b>	<b>22</b>
<b>4.4. Universo y muestra</b>	<b>25</b>
<b>4.5. Métodos e instrumentos de recolección de datos</b>	<b>26</b>
<b>4.6. Procedimientos</b>	<b>26</b>
<b>5. Cronograma de Actividades</b>	<b>28</b>
<b>6. Lista de referencias</b>	<b>29</b>
<b>7. ANEXOS</b>	<b>31</b>

***Índice de Tablas.***

Tabla 3-1. Impurezas y concentración de inhibición de síntesis de ADN.....	18
Tabla 4-1. Especificación de variables .....	23
Tabla 4-2. Puntos aptos para muestreo de metales pesados. ....	25
Tabla 4-3. Técnicas de recolección de información .....	26
Tabla 4-4. Procedimientos de obtención de datos de parámetros.....	27

***Índice de Ilustraciones.***

Ilustración 7-1. Área de estudio.....	31
---------------------------------------	----

## 1. Introducción

Nicaragua posee yacimientos minerales relevantes y de importante valor económico, los cuales aportan sustento a las comunidades inmersas dentro sus límites mineros, sin embargo, en las últimas décadas éstas actividades mineras se han posicionado como las principales fuentes de contaminación para los recursos naturales de estas localidades.

En casos específicos como los municipios de Sto. Domingo y La Libertad, Departamento de Chontales existe afectación directa a fuentes de agua, al suelo, a la biota y puede incluirse también el aire (*CIRA, 2006*).

La afectación radica sobre todo en la incorporación de metales pesados tóxicos al ambiente. Dicha incorporación al ambiente proviene de las diversas etapas del proceso de extracción minera ya sea, del tipo industrial o artesanal a pequeña y mediana escala.

Las actividades mineras a escala artesanal, implica la extracción mediante amalgamiento del mineral junto a un agregado químico, principalmente mercurio (Hg), o mezclándose con Cianuro (CN). El producto residual generado en la molienda o “lama” se deposita en cercanías al lugar o “Rastras” expuestas a escorrentías que lo transportan a fuentes de aguas u otros reservorios como suelo agrícola. (*Chavarría, 2012*)

La generación de esos residuos crea un riesgo para las matrices ambientales como son el agua, el suelo y la biota incluyendo la salud pública. Las aguas, tanto superficiales como subterráneas resultan contaminadas. El suelo resulta alterado por aumentar el contenido de micronutrientes volviéndolos “macronutrientes” como son el Plomo, Bario y Zinc (Pb, Ba y Zn, respectivamente). Este hecho, junto con la incorporación de Hg, implica también la lixiviación que potencializa la contaminación de las aguas subterráneas y afectación a la fuente de abastecimiento de agua potable para las comunidades; y la bio-disponibilidad para las plantas de estos metales tóxicos (*Maksaev, 2009*).

Por lo antes expuesto, resulta sumamente necesario aplicar técnicas o estrategias de recuperación y/o descontaminación de los sitios contaminados por metales pesados producto de las actividades mineras, para disminuir el riesgo para el agua, el suelo mismo, la biota y la salud pública.

Una estrategia de remediación para sitios contaminados por metales pesados es la Biolixiviación, técnica que consiste en emplear microorganismos tanto fúngico o bacteriano que permitan transformar metales en elementos solubles y extractables mediante la producción de metabolitos de bajo peso molecular, sobre todo ácidos orgánicos (*Schinner and Klauser, 2005*).

Actualmente en Nicaragua, no se tiene información completa sobre microorganismos autóctonos que tengan la capacidad de biolixiviar metales pesados. Esto crea la necesidad

de realizar un estudio sobre el potencial de biolixiviación que se tiene en sitios contaminados por metales pesados debido a actividades mineras, para de esta manera valorar la posibilidad de emplear la Técnica de Biolixiviación como una alternativa de Remediación.

Por ello, la investigación que se plantea contribuirá en parte a dar un paso en la solución al problema de la contaminación por residuos mineros; ya que la alternativa de emplear la técnica de biolixiviación permitirá remediar sitios contaminados mediante el aprovechamiento de habilidades microbiológicas (fúngicas) de solubilizar metales pesados por la producción metabólica de ácidos orgánicos.

Así mismo, los resultados del estudio establecerán la viabilidad y optatibilidad de emplear bio-lixiviación como método de remediación de sitios contaminados por metales pesados a través de uso de hongos de géneros tales como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Esto se lograría mediante la aplicación del método de Unidades percoladoras, y medición de metales pesados a través de ICP-OES (Espectrómetro de emisión óptica de plasma acoplada inducida); y el empleo de HPLC para análisis de determinación de ácidos orgánicos.

Por otra parte, se puede decir que se aportará información y conocimientos con respecto a la biolixiviación y su uso como técnica de remediación en el contexto de la situación actual en Nicaragua. Ya que no se han hecho estudios como estos en el país. Esto beneficia a la comunidad científica, a empresas mineras en sus gestiones ambientales con medidas correctivas viables, y empresas encargadas de remediación y/o servicios ambientales en general.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo General:**

Evaluar el potencial de biolixiviación fúngal autóctono e inoculado de metales en sedimentos contaminados en la región minera de Santo Domingo, Chontales.

### **2.2. Objetivos Específicos:**

- ✓ Determinar la eficiencia de lixiviación fúngal autóctona e inoculada (bioaumentada) en base al porcentaje de remoción por percolación de metales de dos sedimentos contaminados y uno de referencia en la región minera de Santo Domingo, Chontales.
- ✓ Relacionar la eficiencia de lixiviación fúngal con algunas propiedades biológicas a monitorear durante los experimentos como son la producción de ácidos orgánicos (cítrico, oxálico, tartárico, glucónico, succínico y fórmico) y la actividad enzimática (lipasa-esterasa) de los sedimentos bajo estudio.

- ✓ Relacionar la eficiencia de lixiviación fungal con algunas propiedades fisicoquímicas (pH, textura, contenido de materia orgánica y Capacidad de Intercambio Catiónico) y la concentración inicial de metales totales y lixiviables o biodisponibles (Agua destilada, CaCl<sub>2</sub> 0.01 N y NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1M) en los sedimentos bajo estudio.
- ✓ Optimizar el tiempo de percolación, contenido de carbohidratos (melaza) y volumen de líquido de percolación (agua) necesario para favorecer el proceso de biolixiviación en los sedimentos bajo estudio
- ✓ Identificar las especies autóctonas que conforman las comunidades fungales de los sedimentos bajo estudio por medio de la técnica de PCR.

### 3. Marco Teórico

A continuación, se expone el marco referencial de la investigación a realizar. Contextualizando aspectos de las actividades mineras y sus impactos; alternativas de remediación de sitios contaminados en la cual se incluye la biolixiviación. Se aborda así mismo, los mecanismos de biolixiviación realizada por los hongos principalmente; además de describir el área de estudio en el cual se enmarca la investigación.

#### 3.1. Contaminación por actividad minera y su impacto ambiental

En las últimas décadas la contaminación ambiental ha aumentado enormemente debido directamente al aumento desmedido de la población y al crecimiento industrial a nivel mundial. Un tema relevante y de gran preocupación ambiental es la contaminación de suelo y de agua por metales pesados y metaloides que pueden ocasionar efectos tóxicos en la salud pública. Entre las fuentes de contaminación por metales y metaloides, se encuentra las actividades mineras en sus distintas fases de exploración, explotación y procesamiento del mineral metálico.

La minería ha sido una de las actividades más antiguas del hombre, incluso se puede afirmar que ha influido prácticamente en el desarrollo de todas las actividades que conocemos en la actualidad. No obstante, la actividad minera en sus diferentes etapas (exploración, explotación y procesamiento) ocasiona impactos ambientales significativos tales como: degradación de ecosistemas y recursos naturales, afectación a cuencas hídricas importantes, pérdida de los recursos forestales y la amenaza para la diversidad biológica (*Castellón, 2010*).

Por otro lado, *Shinner & Klauser (2005)* mencionan que la contaminación de suelo por metales “*pesados se encuentra extendida debido a la industrias, principalmente las de extracción y procesamiento de metal, tenerías, combustión de madera, carbón y aceite mineral*”. De lo cual se podría asegurar, que actividades de extracción y procesamiento de

metal es fuente significativa de metales pesados como contaminantes hacia el suelo y el agua.

Por ello, resulta necesario conocer el proceso general de la actividad minera, ya que permite identificar los impactos ambientales por cada etapa de la minería.

Los proyectos mineros comprenden distintas fases secuenciales que empiezan con la exploración del mineral metálico y termina con el periodo de post-cierre de la mina (ELAW, 2010). Cada fase está asociada a un conjunto de impactos ambientales:

- ❖ **Exploración:** la fase exploratoria busca el conocer la extensión y el valor del yacimiento mineral. Involucra la realización de inspecciones, estudios de campo, perforaciones de prueba y otros análisis exploratorios.
- ❖ **Desarrollo:** luego de confirmarse la existencia del yacimiento mineral, inicia el proceso de desarrollo, el cual consiste de construcción de caminos de acceso y preparación del lugar con el respectivo desbroce.
- ❖ **Explotación:** es la fase que busca la extracción y concentración del metal en la corteza terrestre. No obstante, existen diversos métodos de extracción y concentración. Por lo general, los minerales metálicos se entierran debajo de una capa de suelo o roca común que debe ser removido o excavado para acceder al depósito de mineral metálico. Entre los métodos de explotación se puede mencionar: Minería a cielo abierto, minería aluvial, minería subterránea, reprocesamiento en minas inactivas y relaves.
- ❖ **Extracción del mineral:** comienza la extracción mediante uso de equipos y maquinaria pesada especializada, así como el transporte del mineral a las instalaciones de procesamiento.
- ❖ **Beneficio o procesamiento del mineral:** consistente en el chancado y molienda del mineral, y separar el metal del mineral. El beneficio incluye técnicas de separación física-química como: concentración por gravedad, separación magnética, separación electrostática, flotación, extracción por solventes, proceso de electroobtención, precipitación y amalgamación. Los desechos incluyen desechos de roca, relaves, desechos del lixiviado y disposición de materiales de desecho de lixiviado.
- ❖ **Disposición de relaves:** los relaves son los residuos de mineral que permanece después que ha sido triturado, y que ha sido extraído el metal valioso. La disposición consiste en emplear las diferentes opciones tales como: depósito o cancha de relaves, deshidratación y disposición de relaves secos; y disposición submarina de relaves.
- ❖ **Rehabilitación y cierre:** la meta de la rehabilitación y cierre es el retornar las condiciones del lugar lo más parecido posible a las condiciones ambientales y ecológicas previas a la existencia de la mina.

### 3.1.1. Subproductos del proceso minero

Entre los subproductos generados en el proceso minero se pueden mencionar: los relaves, escombros o desechos de roca, lixiviados y materiales desecho de lixiviación. De estos subproductos, resultan prioritarios los relaves. Los materiales desecho de lixiviación son exclusivos de los procesos mineros de tipo lixiviantes para extracción de cobre.

Con respecto a los relaves, muchas empresas mineras, por conveniencia, simplemente descargan los relaves en los sitios más cercanos, incluyendo ríos y arroyos cercanos. Algunas de las peores consecuencias ambientales se han asociado con la descarga abierta de los relaves, una práctica casi universalmente rechazada en la actualidad (ELAW, 2010).

#### 3.1.1.1. Relaves, Colas o Tailings

Los relaves se pueden definir como el desecho mineral sólido de tamaño entre arena y limo provenientes del proceso de concentración que son producidos, transportados o depositados en forma de lodo (*DGAAM-MINEM Perú*).

Por su parte, *ELAW (2010)* explica que los relaves son un desecho que se produce en grandes cantidades, los cuales pueden contener sustancias tóxicas a niveles peligrosos de arsénico, plomo, cadmio, cromo, níquel y cianuro.

### 3.1.2. Metales pesados

Los metales pesados son aquellos elementos químicos que presentan densidad igual o superior a  $5\text{g/cm}^3$  cuando están en forma elemental, o cuyo número atómico es superior a 20 excluyendo a metales alcalinos y alcalinotérreos. Sin embargo, Hernández (2011) explica que el término “metales pesados” es impreciso; así mismo menciona que realmente el termino se refiere a aquellos metales que siendo elementos pesados son tóxicos para la célula.

Se considera que los metales más peligrosos son el Plomo, Mercurio, Arsénico, Cadmio, Estaño, Cromo, Zinc y Cobre. Los metales pesados son de toxicidad extrema porque, como iones o en ciertos compuestos son solubles en agua.

*Hernández (2010)* clasifica a los metales pesados en dos grupos: los Oligoelementos o micronutrientes y los metales sin función biológica o Macro elementos. Los oligoelementos son necesarios en cantidades pequeñas para los organismos, pero tóxicos en concentraciones altas, incluyen: arsénico (As), Boro (B), Cobalto (Co), Cromo (Cr), Cobre (Cu), Molibdeno (Mo), Manganeso (Mn), Níquel (Ni), Selenio (Se) y Zinc (Zn). Por su parte, los macro elementos son altamente tóxicos tales como: Bario (Ba), Cadmio (Cd), Mercurio (Hg), Plomo (Pb), Antimonio (Sb) y Bismuto (Bi).



La incorporación de metales provocando excesos en el medio ambiente debido a las actividades mineras puede generarse por drenajes de aguas de minas o drenajes ácidos, por desmontes y por los relaves mineros (*Maksaev, 2009*). Maksaev, también explica que algunos metales, como cadmio y mercurio, y metaloides como antimonio o arsénico, los cuales son muy comunes en pequeñas cantidades en depósitos metálicos son altamente tóxicos, aun en pequeñas cantidades, particularmente en forma soluble, la cual puede ser absorbida por los organismos vivos.

El proceso de cianuración y oxidación de aguas acidas o drenaje acido de minas puede contribuir a la liberación y consecuente contaminación por metales tales como Cobalto, Manganeso, Niquel, Plomo y Zinc. La Empresa *ELAW (2010)* explica que el drenaje acido disuelve metales tóxicos como el cobre, aluminio, cadmio, arsénico y mercurio que se encuentra en la roca; estos metales arrastrados por el agua, pueden viajar largas distancias contaminando riachuelos y agua subterránea.

### **3.1.3. Impacto ambiental a matrices ambientales**

La actividad minera en sus diferentes escalas ocasiona diferentes tipos de impactos ambientales dependiendo del proceso que se utiliza y de cada uno de las operaciones unitarias, entre los cuales se puede mencionar grosso modo.

- Degradación de ecosistemas y recursos naturales (suelos, bosques, aguas)
- Afectación a cuencas y micro cuencas hídricas importantes.
- Pérdida de los recursos forestales y la fuerte amenaza que representa para la diversidad biológica.
- El transporte de sedimentos afecta en gran medida los recursos hídricos, tanto en su calidad como cantidad, lo mismo que su flora y su fauna acuática.
- El cambio de uso del suelo en los territorios sin tomar en consideración su potencial, agudizando los problemas erosivos y por ende la degradación de los ecosistemas.
- Las fuentes de aguas superficiales (ríos, quebradas, etc.) son utilizadas como receptores de aguas residuales, desechos sólidos industriales y sedimentos, principalmente.
- La pérdida del suelo al separar su capa fértil causando disminución de la productividad.
- Alto grado de sedimentación de fuentes hídricas.
- Contaminación con metales pesados a los cuerpos de aguas superficiales y subterráneas.

### *3.1.3.1. Impacto ambiental al recurso hídrico*

Puede decirse que el impacto más significativo de las actividades mineras es el efecto en la calidad y disponibilidad del recurso hídrico en la zona del proyecto. Entre los impactos identificados se puede mencionar (*ELAW, 2010*):

- Drenaje ácido de mina y lixiviados contaminantes lo cual ocasiona daño en los peces y especies acuáticas, incorporación de metales tóxicos al disolver los metales como cobre, aluminio, cadmio, arsénico, plomo y mercurio.
- Erosión de suelos y desechos mineros en aguas superficiales: la erosión es un efecto siempre potencial por las actividades mineras; esta erosión puede causar grandes cantidades de sedimentos cargados de contaminantes en los cuerpos de aguas cercanos. Entre los impactos ocasionados por ello está el encontrar concentraciones elevadas de material particulado (Sólidos suspendidos y disueltos) en agua superficiales; disminución del pH y carga de metales; y erosión del lecho y bancos de los cursos de agua.
- Embalses de relaves y lixiviación en pilas y botaderos. Lo cual involucra impactos como contaminación de agua subterránea por la lixiviación de sustancias tóxicas y agua superficiales que reciben las descargas.
- Desaguado de la mina: que incluye impactos tales como reducción o eliminación de flujos de aguas superficiales, degradación de calidad de aguas superficiales, degradación del hábitat, reducción de abastecimiento doméstico mediante pozos.

### *3.1.3.2. Impacto ambiental a los suelos*

El suelo es alterado como resultado de las actividades mineras. Una de las anomalías biogeoquímicas que se generan al momento de la extracción, es el aumento de la cantidad de micro elementos en el suelo convirtiéndolos a niveles de macro elementos los cuales afectan negativamente la biota y calidad de suelo; estos afectan el número, diversidad y actividad de los organismos del suelo, inhibiendo la descomposición de la materia orgánica del suelo (*Hernández, 2011*)

De acuerdo a *Cuevas (2010)* los suelos que quedan tras una explotación minera contienen todo tipo de materiales residuales, escombros estériles, entre otros, lo que representa graves problemas para el desarrollo de la cubierta vegetal, siendo sus características más notables las siguientes: clase textural desequilibrada, ausencia o baja presencia de la estructura edáfica, propiedades químicas anómalas, disminución o desequilibrio en el contenido de nutrientes fundamentales, ruptura de los ciclos biogeoquímicos, baja profundidad efectiva, dificultad de enraizamiento, baja capacidad de cambio, baja retención de agua y presencia de compuestos tóxicos.

Los metales tienden a acumularse en la superficie del suelo quedando accesibles al consumo de las raíces de los cultivos. Las plantas cultivadas en suelos contaminados

absorben en general más oligoelementos y la concentración de éstos en los tejidos vegetales está a menudo directamente relacionada con su abundancia en los suelos, y especialmente en la solución húmeda. Se menciona también que excesivas concentraciones de metales en el suelo podrían impactar la calidad de los alimentos, la seguridad de la producción de cultivos y la salud del medio ambiente, ya que estos se mueven a través de la cadena alimenticia vía consumo de plantas por animales y estos a su vez por humanos ([Puga et al, 2006](#)).

### **3.1.3.3. Impacto ambiental a la atmosfera.**

El transporte de emisiones en el aire ocurre durante todas las etapas del ciclo de vida de una mina, si bien en particular se dan durante la exploración, desarrollo, construcción y operación. Las operaciones mineras movilizan grandes cantidades de material; requieren maquinaria pesada y equipos industriales para procesar el mineral. Las pilas o depósitos de desechos contienen partículas pequeñas que pueden ser fácilmente dispersadas por el viento ([ELAW, 2010](#)).

Las mayores fuentes de contaminación del aire en operaciones mineras son

- Material particulado transportado por el viento como resultado de excavaciones, voladuras, transporte de materiales, erosión eólica (más frecuente en tajos abiertos), polvo fugitivo proveniente de los depósitos de relaves, depósitos, pilas de desechos, caminos. Las emisiones de los gases de escape de fuentes móviles (vehículos, camiones, maquinaria pesada) también contribuyen a aumentar el nivel de material particulado; y
- Emisiones gaseosas provenientes de la quema de combustibles en fuentes estacionarias como móviles, voladuras y procesamiento de minerales.

Otra forma de contaminación de la atmosfera por actividad minera es la generación de ruido y vibración cuyas fuentes pueden incluir motores de vehículos, carga y descarga de rocas, voladuras, generación de energía, entre otras fuentes relacionadas con la construcción y actividades de la mina.

Dentro del proceso de recuperación del mercurio amalgamado con el oro existe una fuente de calor aplicado para evaporar el mercurio, el cual al volatilizarse es emanado a la atmósfera, disponible al contacto con el tracto respiratorio ([CIRA/UNAN-Managua; MARENA; INIFOM, 2006](#)).

## **3.2. Alternativas de remediación de sitios contaminados por metales pesados.**

En la actualidad existen distintas técnicas de remediación o descontaminación de sitios contaminados por metales pesados. Las alternativas pueden clasificarse entre Técnicas de tratamiento físico-químico y tratamientos biológicos. Entre las técnicas fisicoquímicas se puede mencionar la técnica de “lavado ex-situ”, flushing (técnica in situ), electrocinética in

situ, adición de enmiendas o químicos (Ortiz, Sanz García, Dorado Valiño, & Villar Fernandez, 2008).

Según Ortiz, et al, (2008) las técnicas biológicas mayormente empleadas para remediar sitios contaminados por metales pesados se basan en tratamientos de recuperación que disminuyen la toxicidad de los metales tóxicos a través de la actividad biológica natural mediante reacciones que forman parte de sus procesos metabólicos.

En este aspecto, enfocados en las técnicas biológicas, surge el término bio-transformación de metales realizados principalmente por microorganismos. Según Gadd (2004) los microorganismos están estrechamente relacionados con la biogeoquímica de los metales a través de una serie de procesos que determinan su movilidad y biodisponibilidad.

Se debe señalar, que los microorganismos no pueden degradar ni destruir metales, pero si pueden controlar la especiación y transformación a formas más o menos tóxicas mediante mecanismos de oxidación, reducción, metilación, dimetilación, formación de complejos, biosorción y acumulación intracelular.

### 3.3. Biolixiviación

Entre las técnicas biológicas de recuperación de sitios contaminados por metales pesados que ha surgido en las últimas décadas es la biolixiviación; técnica que busca solubilizar de manera ex-situ, los metales pesados mediante el uso de microorganismos tanto hongos como bacterias.

La biolixiviación está basada en la capacidad de los microorganismos para transformar compuestos sólidos en elementos solubles y extractables. Las ventajas de la tecnología de biolixiviación incluyen condiciones de reacción suaves, bajo consumo de energía, proceso simple, bajo impacto ambiental y es adecuado para el bajo grado de colas mineras, residuos y suelos contaminados (Deng et al, 2012).

#### 3.3.1. Mecanismo de Biolixiviación

Generalmente, los microorganismos están involucrados en la movilidad de los metales a través de su oxidación, reducción, acumulación y sus metabolitos durante la biolixiviación. Se han realizado estudios que especifican los mecanismos de biolixiviación según el tipo y especie de microorganismo. Por ejemplo, el mecanismo de biolixiviación de *A. niger*, *P. simplicissimum*, *P. purpurogenum* fue relacionada a la producción de metabolitos de bajo peso molecular, principalmente ácidos orgánicos tales como ácido glucónico, ácido pirúvico, ácido cítrico, ácido oxálico, ácido málico y ácido succínico, pero es diferente que el mecanismo de *R. rubra*, *A. thiooxidans* y *A. ferrooxidans*.

La biolixiviación del *R. rubra* fue relacionada a su actividad metabólica y a macromoléculas estructural de la capsula y pared celular. La biolixiviación del *A.*

*thiooxidans* y *A. ferrooxidans* contribuyen a los mecanismos de “contacto” y “no contacto”. El mecanismo de “contacto” toma en cuenta que la mayoría de las células se adhieren a la superficie de los sustratos de biolixiviación. El mecanismo de “no contacto” está relacionado a las reacciones redox tales como la reducción del hierro (II) a la oxidación de Azufre.

Según *Bayat (2011)* se utilizan tres grupos de microorganismos utilizados para los procesos de lixiviación: bacterias autotróficas, bacterias heterotróficas y hongos. Por su parte, *Gadd (2004)* expresa la clasificación de la biolixiviación en función de los organismos heterótrofos y autótrofos. A continuación se expresa las características de los tipos de lixiviación microbiana explicado por *Gadd (2004)*:

#### **3.3.1.1. Lixiviación heterotrófica (quimio-organotrófica).**

Se basa en el principio de que los microorganismos pueden acidificar su ambiente por flujo de protones vía membrana plasma ( $H^+$ -ATPases), manteniendo el balance de carga; o como un resultado de acumulación de bióxido de carbono. La acidificación puede llevar a liberar metales por un gran número de rutas, por ejemplo: competición entre protones y el metal y un no metal.

El metabolismo heterotrófico puede además lograr una lixiviación como resultado del flujo de ácidos orgánicos y sideróforos. Los ácidos orgánicos proveen ambos protones y aniones complejantes de metales. Ya que los aniones Citrato y oxalato pueden formar complejos estables con un gran número de metales.

#### **3.3.1.2. Lixiviación Autotrófica:**

La mayoría de la lixiviación autotrófica es llevada a cabo por quimioautotrófica, bacterias acidófilas la cual fija dióxido de carbono y obtienen energía de la oxidación del hierro ferroso o compuestos de azufre reducido. Los microorganismos involucrados incluyen bacterias sulfuro-oxidantes.

### **3.3.2. Microorganismos de lixiviación-Hongos**

Muchas especies de microorganismos han sido reportados como aptos para biolixiviar metales pesados en suelos, incluyendo el *Aspergillus niger*, *Penicillium purpurogenum*, *Rhodotorula rubra*, *Acidithiobacillus thiooxidans* y *Acidithiobacillus ferrooxidans*. El mecanismo de solubilización del metal durante la biolixiviación está relacionada a un proceso químico, a pesar de la unión de los microbios al mineral puede mejorar la disolución (*Deng et al, 2012*)

La especie de hongos *Aspergillus niger* es una de las especies mayormente utilizadas en biolixiviación y presenta ventajas sobre las bacterias biolixiviantes, incluyendo la capacidad de crecer en valores de pH altos y una mayor rapidez en el factor de lixiviación.

(Xu and Ting, 2004). Los hongos han sido también utilizados en la producción de ácidos orgánicos, como cítricos, oxálicos, y glucónico. Estos ácidos son excelentes lixiviantes de metales pesados a partir de materiales minerales y desechos sólidos. Los hongos también pueden crecer fácilmente en montos sustanciales empleando técnicas no sofisticadas de fermentación y medios baratos de crecimiento. De igual manera la lixiviación fungal puede servir como una opción económicamente viable para la remoción/recuperación de metales iónicos a partir de soluciones acuosas (*Gadd, 2004*).

### **3.3.2.1. Generalidades de los Hongos**

Los hongos se conocen como organismos unicelulares y pluricelulares principalmente con estructuras hifales, los cuales obtienen sus nutrientes por absorción. Estas definiciones comprenden los organismos heterogéneos convencionalmente estudiados por micólogos. La nutrición heterotrófica puede ser lograda por diferentes estilos de vida saprofítica, parásita o simbiótica (*Espinosa & González, 2007*).

### **3.3.2.2. Clasificación**

*Espinosa & González (2007)* expresan que la clasificación de los hongos está sujeta a muchos cambios como consecuencia de intensas investigaciones en años recientes. El reino fungí se clasifica generalmente en cinco Filos: *Zigomycota (zigomicetes)*; *Ascomycota (ascomicetes)*; *Basidiomycota (basidiomicetes)*; *Chytridiomycota (chitridiomicetes)*; *Deuteromycota (deuteromicetes)*: los criterios usados para distinguir estas cinco divisiones incluyen tanto características de la estructura básica como patrones de reproducción.

### **3.3.2.3. Importancia de los Hongos**

Uno de los usos principales de los hongos es el desarrollo de productos bioquímicos como ácidos orgánicos (cítrico, fumárico, láctico e itacónico) y giberilinas. Las penicilinas naturales y semisintéticas son también productos de importancia económica, de lo que puede ser considerado como micología aplicada tradicional. Nuevos agentes farmacológicos importantes tales como, antitumorales o inmuno-moduladores como la ciclosporina, son productos fúngicos que han adquirido trascendencia reciente. Los hongos filamentosos y las levaduras pueden también ser utilizadas para transformar o modificar compuestos de utilidad médica, como la cortisona. Tales avances dan muestra del potencial de los hongos manipulados genéticamente.

También se está produciendo un significativo desarrollo en el uso de hongos para la biotecnología agrícola y medioambiental, así como en biotecnología industrial diferente de las tradicionales industrias de fermentación. En el ámbito agrícola se ha intentado utilizar

hongos como agentes de control biológico para reducir las poblaciones dañinas de insectos, malas hierbas y microorganismos patógenos de plantas. La biotecnología medioambiental está actualmente dedicada en su mayor parte a tecnologías para el tratamiento de residuos peligrosos como cianuro y a la biorremediación (descontaminación) de suelos contaminados por pesticidas, metales pesados y otros compuestos químicos.

#### *3.3.2.4. Interacción entre Microorganismos y Metales*

En la última década, numerosas revistas, documentos y literaturas concernientes a metales y su interferencia con microorganismos han sido publicados. De esta manera, Espinosa et al (2007) hace mención de los mecanismos de concentración de metales, las cuales pueden ser categorizadas por lo siguiente:

- Interacción Extracelular.
- Interacción Célula – Superficie.
- Interacción Intracelular.

**Interacción Extracelular:** Esta interacción envuelve principalmente polímeros extracelulares, proteínas, metabolitos ácidos y cambios en el medio ambiente local, debido a procesos bioquímicos; en este tipo de interacción los microorganismos no tienen un contacto directo con metales.

Los microorganismos pueden entrar en contacto con los metales indirectamente por la producción de metabolitos o por algunas reacciones bioquímicas. Este proceso beneficia al medio ambiente en algunas vías:

- a) Lixiviación de aleaciones metálicas o minerales nativos por la producción de ácidos.
- b) Descarga de metales con un límite de óxido de hierro y manganeso por reducción microbiana.
- c) Inmovilización de metales por la formación de sales insolubles.

**Interacción Célula–Superficie:** Algunos metales tienden a unir la superficie celular microbiana a resultados de grupos funcionales. Una de la más importante interacción célula – superficie es la biosorción; que es uno de los mecanismos más significantes por lo cual los microorganismos remueven los metales concentrados de una solución.

**Interacción Intracelular:** Algunos procesos particulares de transporte causan efectos de acumulación de metales en la célula microbiana. Estos pueden causar detoxificación del medio ambiente a través de la conversión de metales insolubles a formas más volátiles.

#### *3.3.2.5. Ventajas y desventajas de los hongos asociados a la lixiviación.*

Entre las desventajas del uso de hongos para procesos de biolixiviación se puede mencionar lo siguiente:



- a) Generalmente el hongo requiere de grandes cantidades de carbón orgánico para el crecimiento y generación del agente lixivante.
- b) Los biohidrometalurgistas no tienen un tratamiento conocido con el hongo.
- c) Los procesos de lixiviación con hongos es más lenta que la lixiviación con bacterias.

Sin embargo estos puntos son menos significantes después de los siguientes factores a considerar:

- Algunos materiales engloban metales con aumento de pH del medio durante el proceso de lixiviación.
- La formación de complejos con iones metálicos por el cual uno u otro es más soluble en medio ambiente neutral o menos tóxico, es otra superioridad por la presencia del hongo como agente lixivador.
- Los procesos de lixiviación convencional son solo aplicables a materiales que contienen compuestos sulfurados.
- Los hongos como microorganismos son capaces de consumir fuentes de carbón orgánico por el cual muchos pueden estar sufriendo de desechos orgánicos de fácil acceso.
- La acción de metabolitos en la lixiviación fúngica no ha tenido una investigación total y esto es controversial acerca de diferentes metabolitos y su acción de solubilización sobre metales. Sin embargo se sugiere 3 mecanismos por el cual los compuestos de metales sólidos pueden ser lixiviados:
  - Acidófilos.
  - Complexólisis.
  - Redoxólisis.

### 3.3.3. Ácidos Orgánicos

Uno de los principales usos biotecnológicos de los hongos es la producción por fermentación de un conjunto de ácidos orgánicos, como el cítrico, oxálico, glucónico, entre otros; siendo el cítrico el más importante para la lixiviación.

#### 3.3.3.1. Ácido Cítrico

El ácido cítrico es ampliamente utilizado en la industria de alimentos para la producción de bebidas no alcohólicas, sales efervescentes y medicina, para el plateo de espejos y como aditivo en los tintes. El ácido cítrico se producía a partir de los frutos cítricos, pero ahora casi el 99% de la producción mundial se obtiene por fermentación de hongos, en la actualidad la producción anual de este compuesto excede las 200.000 toneladas.

El ácido cítrico es fundamentalmente producido por 2 especies de *Aspergillus* llamadas *A. niger* y *A. wentii*. El ácido cítrico es un tricarboxílico con 6 átomos de carbono.



### 3.3.3.1.1. Biosíntesis Fúngica del Ácido Cítrico

El ácido cítrico (ácido 2 hidroxipropano- 1, 2,3tricarboxílico) es un producto metabólico primario y se forma en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. La glucosa es la principal fuente de carbono utilizada para la producción de ácido cítrico. En muchos microorganismos el 80% de la glucosa utilizada para la biosíntesis de ácido cítrico se metaboliza y 20% por reacciones del ciclo de la pentosa fosfato. Durante la fase de crecimiento la relación entre estas dos vías es de 2:1.

Si se utilizan como fuente de carbono acetato o compuestos alifáticos superiores, como n - alcanos (C9 – C23), se encuentran en *A-niger* una secuencia anaplerótica. En ausencia de glucosa opera el ciclo del glioxalato; la isocitratoliasa se induce, y está presente la malato sintasa. Si se añade glucosa el ciclo del glioxalato se reprime, aunque la isocitratoliasa es todavía parcialmente activa.

### 3.3.4. Factores que influyen en Biolixiviación

#### 3.3.4.1. Parámetros o condiciones de biolixiviación

Shinner & Klauser, (2005) hacen mención sobre las condiciones que influyen en los procesos de biolixiviación se incluyen diversos parámetros medibles como lo son:

- Cantidad de sustrato disponible
- Temperatura de ambiente para crecimiento de microorganismos
- pH condicionante para los microorganismos.
- Familia y género de microorganismos.
- Condiciones químicas-físicas del medio o muestra.

#### 3.3.4.2. Eficiencia de lixiviación

La efectividad de la biolixiviación depende esencialmente de la eficiencia de los microorganismos y de la composición química del sólido. El máximo rendimiento de extracción de metal puede lograrse solamente cuando las condiciones de lixiviación corresponden con las condiciones óptimas de crecimiento de los microorganismos.

Para ello, es necesario complementar el medio de cultivo con sales de amonio, fosfatos y magnesio. Un adecuado suministro de oxígeno es un requisito para el buen crecimiento y la mayor actividad lixivante de las bacterias. En el laboratorio esto puede lograrse por aireación o por agitación. También el ajuste del valor de pH correcto es una condición necesaria para el crecimiento de la cepa y para la solubilización de los metales. El pH en el proceso de biolixiviación depende de la capacidad tampón. La capacidad tampón es lentamente disminuida por la producción continua de ácido a partir de la oxidación de compuestos del azufre.

### **3.4. Identificación genómica de microorganismos**

La dinámica poblacional natural que presentan todos los procesos de reacciones, sean estas químicas, biológicas o ambas, representan el micro-cosmo que hace posible las aplicaciones tecnológicas de hoy en día. El proceso de biolixiviación de metales pesados no es la excepción, es necesario comparar y evaluar los organismos especializados a nivel individual para conocer su comportamiento ante determinadas condiciones. Hoy en día es posible secuenciar una muestra total de ADN e identificar filogenéticamente que especie se encuentra presente en la muestra.

#### **3.4.1. Técnica de PCR**

Aproximadamente desde 1990 avances significativos en técnicas de biología molecular han transformado la microbiología ambiental y la ecología microbiana, éstas técnicas han sobrepasado la mayoría de las limitaciones de las técnicas dependientes del cultivo microbiano a través de la extracción de ácidos nucleicos directamente (ADN y ARN) provenientes de muestras terrestres o acuáticas, y que teóricamente representa el 100% de las especies presentes en la muestra. Una de las técnicas moleculares de mayor uso es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

#### **3.4.2. Estructura del ADN.**

El ADN contiene 2 hélices o hebras, una complementaria y otra paralela, ambas están compuestas por ácidos fosfóricos y desoxirribosa. A su vez están unidos con nucleótidos, los cuales se consideran elementos estructurales del ADN y están conformado por: una base (píricas y pirimidínicas) + azúcar (pentosas o desoxirribosa) + fósforo. La nomenclatura de los nucleótidos se presenta así: dATP, dGTP, dTTP, dCTP.

Así mismo el ADN debe transmitir su información a todas las células y se genera a través de 3 procesos:

1. Replicación: se forman 2 copias de ácidos nucleicos bicatenario.
2. Transcripción: un segmento del ADN se transforma en ARN.
3. Traducción: Traducción del ARN a aminoácidos que forman proteínas.

#### **3.4.3. Extracción y Purificación del ADN provenientes de muestras de suelos.**

La extracción del ADN de las muestras de suelo se puede hacer través de la técnica de PCR. Es un requerimiento necesario que las muestras deben conservarse en congelación (-20 a -80 °C).

El objetivo de la técnica de PCR es amplificar secuencias de genes a partir de una comunidad total de AND extraído de una muestra ambiental obteniendo genotipos catabólicos; en el caso de identificación de hongos usando la secuencia del gen promotor

18s ARN. Una de polimerasas de ADN a temperatura estable sintetiza una nueva hebra de ADN al extender el cebador usando la hélice complementaria como plantilla, así que se generan copias duplicadas de la secuencia perseguida o meta, éste ciclo se repite 20 o 30 veces resultando una amplificación exponencial de la secuencia perseguida

Así mismo el ADN extraído de la muestra total debe someterse a un proceso de purificación, en donde se deben remover otros ácidos orgánicos, propios de la muestra, que pueden inhibir la síntesis correcta del ADN polimerasa. A continuación se muestran algunos compuestos o impurezas que se deben extraer:

**Tabla 3-1. Impurezas y concentración de inhibición de síntesis de ADN.**

Impurezas inhibidoras	Concentración de inhibición
Fenol	>0,005 %
Etanol	> 0,1 %
Isopropanol	>1%
Acetato de sodio	>1%
Cloruro de sodio	>5mM
EDTA	>25mM
Hemoglobina	>0,5mM
Heparina	>16M/L
Urea	>0,15 UI/mL
Mezcla de reacción.	>15%

Fuente: OMS (2007)

Las técnicas de purificación varían, desde extracción por filtración o precipitación, hasta elementos propios de cromatografía, usando sílice o vidrio y a través de solventes afines a las sustancias inhibidoras, como algunos detergentes para la extracción de lípidos y proteínas.

#### 3.4.4. Tratamiento y análisis del ADN purificado.

Para realizar el bioensayo en PCR se requiere un material plantilla para realizar la amplificación, ésta plantilla se conoce como cebador. El cebador, compuesto por oligonucleótidos debe escogerse a partir de su punto de fusión, la longitud en pares de bases (pb) y el tamaño.

La enzima primasa une el cebador de ARN al ADN monocatenario para actuar como extremo 3'OH en donde la polimerasa comienza su síntesis. El cebador ARN se elimina y el hueco es rellenado por ADN polimerasa. La polimerasa avanza a través de toda la célula recogiendo dNTP libres. La ADN polimerasa III se encarga de la síntesis progresiva de nuevas hebras de ADN. Mientras las cadena monocatenaria es débil proteínas se unen a su

alrededor para protegerla de la degradación. El ADN polimerasa es catalizador en presencia de iones  $Mg^{2+}$ .

El ADN original (muestra) conocido como ADN diana es desenrollando por enzimas Topoisomerasa y helicasa en el proceso de Desnaturalización, el cual depende de: La temperatura de fusión el solvente, el pH y la concentración de sales. Los cebadores están compuestos por nucleótidos cortos (16-30 pb) la distancia entre ellos debe ser menor a 10 kb y la concentración debe ser de 1mM.

### **3.5. Área de Estudio**

El sitio en el que se pretende llevar a cabo la investigación corresponde a la región del centro de Nicaragua, de Chontales, específicamente en el municipio de Santo Domingo. El municipio es considerado como un sitio cuya principal actividad económica es la minería de oro y en menor grado agrícola y ganadera.

#### **3.5.1. Generalidades del sitio**

Santo Domingo presenta clima del tipo sabana tropical con precipitaciones anuales de 1100 a 2000 mm; y con temperaturas promedio de 25° a 27°C. Actualmente presenta una población que sobrepasa los 16 mil habitantes, de los cuales un alto porcentaje (60% aprox.) habitan en el área rural.

El relieve es altamente montañoso, alcanzando altura máximas de 505 msnm. El municipio colinda al norte con el municipio de La Libertad; al sur con los municipios de Sto. Tomás y San Pedro de Lóvago; al este con el municipio del Ayote y al oeste con el municipio de la Libertad.

Los principales ríos del municipio de Santo Domingo son: Siquia, El Sucio (Afluente del Siquia), Timulí, Tawa y el Guineal. El Río Artiguas corre al centro de la ciudad.

Debido al suelo, subsuelo, a la pluviosidad de aguas, clima, riqueza hidrográfica y las montañas proveen al municipio una variedad y abundancia en recursos naturales. En el subsuelo se encuentran (o se encontraban) grandes yacimientos de cuarzo mineralizado en oro y plata. Por ello, en los alrededores del casco urbano la actividad minera es la más importante.

#### **3.5.2. Actividad minera en área de estudio**

En el municipio de Santo Domingo la actividad minera es considerada el rubro principal de la economía, además de la agricultura y ganadería.

*Espinoza & Espinoza, (2005)* explican que las actividades de beneficio de oro, realizadas en Santo Domingo son llamadas pequeña minería, y minería artesanal. La primera es definida, en artículo 40 de la ley de minas, Ley 387 (*MIFIC, 2001*), como el aprovechamiento de los recursos mineros que realizan personas naturales o jurídicas, que no exceden una capacidad de extracción y/o procesamiento de 15 toneladas métricas por día; y la segunda, es definida en el artículo 41 de la misma ley, como el aprovechamiento de los recursos mineros que desarrollan personas de manera individual o en grupos organizados, mediante el empleo de técnicas exclusivamente manuales.

El procesamiento de la mena en Santo Domingo se realiza utilizando el método de amalgamación en los planteles de beneficio con sistemas de molienda de mena, así como en zonas de acumulación aluvial de los sedimentos de las colas de planteles de beneficio.

No obstante, se hace necesario distinguir, dentro del contexto de la actividad minera en el Departamento de Chontales, dos segmentos profundamente diferenciados a escala técnica y de producción, siendo estos: **1.** La empresa trasnacional con operaciones industriales, a quien se le otorgó la concesión minera por un período de veinticinco años, y **2.** El segmento artesanal de pequeña y mediana escala.

Las actividades a escala artesanal, involucran en su proceso de extracción un mecanismo de amalgamamiento del mineral (oro) junto a un agregado químico, principalmente Mercurio, aunque en algunas etapas se puede mezclar con Cianuro para aumentar la eficiencia de extracción. El producto residual de la molienda conocido como “lamas” se deposita en las cercanías del lugar de molienda también conocidas como “rastras” sin ningún tratamiento y expuestos a procesos de meteorización, como la esorrentía pluvial, que arrastra el sedimento a fuentes de aguas y otros reservorios, como suelo agrícola, contaminándolos (*Picado & Bengtsson, 2012*).

En el municipio se generan una serie de contaminantes producto de las labores mineras, además de las sustancias que se utilizan para el proceso. Estos contaminantes agilizan la disolución de metales que van a parar junto con los demás desechos a los cauces de los ríos Sudio directamente en el caso de Santo Domingo. Por ello, en diversos estudios se ha encontrado altas concentraciones de metales pesados en diversos puntos del área. Esto no es solamente producto de las actividades de explotación minera, sino que responde al patrón de formación geológica de la subcuenca donde pueden distinguirse amplias áreas mineralizadas (*CIRA/UNAN-Managua; MARENA; INIFOM, 2006*).

### **3.5.3. Sitios sospechosos de contaminación significativa por Metales pesados**

Según *MARENA (2006)* en Santo existen 6 puntos geográficos aptos para el muestreo de metales pesados los cuales están detallados en una base de datos municipal, sin embargo existen otros puntos de procesamientos de minerales los cuales se consideran “ilegales” o no autorizadas por la municipalidad.

Todas las actividades de contaminación puntual se ubican muy cerca del casco urbano en las márgenes de los ríos, su naturaleza es diversa, así mismo las sustancias contaminantes, las cuales pueden potenciar el riesgo de contaminación por sinergia al mezclarse las descargas de las industrias.

## **4. Diseño metodológico**

Una vez que se especificó el problema y se definió el alcance de la investigación de Evaluar el potencial de biolixiviación fungal, se debe desarrollar el diseño de investigación, o bien, el plan o estrategia para obtener la información que se desea.

Ya que la investigación es cuantitativa se requiere un diseño de investigación del tipo experimental, en el que se requiere manipular tratamientos, influencias o intervenciones (condiciones y organismos) para observar los efectos sobre otras variables (eficiencia) en una situación de control.

### **4.1. Tipo de estudio**

La investigación es de tipo cuantitativa ya que es secuencial y probatorio. Además, requiere una recolección de datos fundamentado en la medición de parámetros que conforman la variable eficiencia. Dichas mediciones se realizan siguiendo procedimientos aceptados por la comunidad científica por lo que confirma el uso de datos numéricos con el respectivo análisis mediante métodos estadístico.

#### **4.1.1. Alcance del problema de investigación:**

El tipo de alcance de la investigación relacionada al potencial de biolixiviación autóctono de un sitio contaminado por actividad minera, es del tipo Descriptivo y en cierto modo es explicativo. No obstante, previo al alcance descriptivo, se dio el alcance exploratorio ya que se indagó sobre el tema y se encontró que en el contexto de Nicaragua se han hecho pocos estudios al respecto.

Resulta ser de alcance descriptivo ya que se pretende especificar características, condiciones, propiedades de un proceso de biolixiviación; con el valor útil de mostrar la eficiencia y viabilidad de esta técnica como alternativa de remediación de sitios contaminados.

A su vez, ya que se busca un sentido de entendimiento de la biolixiviación fungal puede considerarse también como de sentido explicativo.

## 4.2. Área de estudio

El área de estudio está constituido por los diferentes puntos o sitios legales de disposición de residuos mineros o relaves en el municipio de Santo Domingo-Chontales. Cabe señalar, que el municipio de Santo Domingo presenta a la actividad minera como uno de los rubros económicos principales. De manera que en cierta distribución espacial por diversos puntos a lo largo del municipio se encuentran sitios con fuerte actividad minera y respectiva contaminación puntual. (*Ver Ilustración 1*)

En el segmento de universo y muestra se especifica los puntos críticos identificados por MARENA como sitios sospechosos de alta contaminación por metales pesados.

## 4.3. Hipótesis y especificación de variables

En las investigaciones cuantitativas de tipo Descriptivo no siempre es necesario realizar una formulación de hipótesis. Solo se formula cuando se pronostica un hecho o dato (*Hernandez Sampieri, Fernandez Collado, & Baptista Lacayo, 2010*).

Por eso, tentativamente se podría formular una hipótesis pronosticando la eficiencia de biolixiviación en base a los parámetros que influyen en el proceso de biolixiviación, siguiendo un modelo cinético para microorganismos fungales.

No obstante, no resulta muy propicio para el caso formular una hipótesis al respecto. Sin embargo si se realizará pruebas estadísticas a los datos obtenidos para valorar la fiabilidad y grado de confianza de los datos.

Hay potencial autóctono de bio-lixiviación y que la especie autóctona es la que presenta la más eficiente

Tabla 4-1. Especificación de variables

Objetivo General	Objetivos Específicos	VARIABLES	Sub-variables	Indicadores
Evaluar el potencial de biolixiviación fungal autóctono e inoculado de metales en sedimentos contaminados en la región minera de Santo Domingo, Chontales	Determinar la eficiencia de lixiviación fungal autóctona e inoculada (bioaumentada) en base al porcentaje de remoción por percolación de metales de dos sedimentos contaminados y uno de referencia en la región minera de Santo Domingo, Chontales.	Eficiencia fungal de lixiviación autóctona  Eficiencia fungal de lixiviación inoculada o bioaumentado	% Remoción de metales por percolación	Aumento en la concentración de metales lixiviados diariamente en eluato (ICP-OES)
	Relacionar la eficiencia de lixiviación fungal con algunas propiedades biológicas a monitorear durante los experimentos como son la producción de ácidos orgánicos (cítrico, oxálico, tartárico, glucónico, succínico y fórmico) y la actividad enzimática (lipasa-esterasa) de los sedimentos bajo estudio.	Producción de ácidos orgánicos  Actividad enzimática	Concentraciones diarias en eluato de ácidos (cítrico, oxálico, tartárico, glucónico, succínico y fórmico)  Actividad de lipasa-esterasa diaria en los suelos	Aumento en las concentraciones de ácidos orgánicos en eluato y actividad enzimática en el suelo
	Relacionar la eficiencia de lixiviación fungal con algunas propiedades fisicoquímicas (pH,	Eficiencia de lixiviación  Propiedad física	% Remoción de metales por percolación  Textura	Diferencia en la eficiencia de biolixiviación dependiendo de propiedades físico-químicas



	<p>textura, contenido de materia orgánica y Capacidad de Intercambio Catiónico) y la concentración inicial de metales totales y lixiviables o biodisponibles (Agua destilada, CaCl<sub>2</sub> 0.01 N y NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1M) en los sedimentos bajo estudio.</p>	<p>Propiedades químicas</p> <p>Concentración de metales totales y lixiviables o biodisponibles</p>	<p>pH, contenido de materia orgánica y Capacidad de Intercambio Catiónico</p> <p>Metales totales extractables por digestión</p> <p>Metales extractables con agua destilada, CaCl<sub>2</sub> 0.01 N y NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1M</p>	<p>y concentraciones iniciales y lixiviables o biodisponibles de metales</p>
	<p>Identificar las especies autóctonas que conforman las comunidades fungales de los sedimentos bajo estudio por medio de la técnica de PCR.</p>	<p>Especies de hongos autóctonos</p>	<p>Región de ADN</p>	<p>Taxonomía genómica</p> <p>Número de especies</p> <p>Tamaño de pares de bases</p>
	<p>Optimizar el tiempo de percolación, contenido de carbohidratos (melaza) y volumen de líquido de percolación necesario para favorecer el proceso de biolixiviación en los sedimentos bajo estudio</p>	<p>Tiempo de percolación</p> <p>Contenido de carbohidratos (melaza)</p> <p>Volumen de líquido de percolación (agua)</p>		<p>Aumento en la eficiencia de biolixiviación en los sedimentos de estudio</p>

#### 4.4. Universo y muestra

Actualmente en Santo Domingo (tomado como el universo del presente estudio) existen 6 puntos geográficos aptos para el muestreo de metales pesados los cuales están detallados en una base de datos municipal, sin embargo existen otros puntos de procesamientos de minerales los cuales se consideran “ilegales” o no autorizados por la municipalidad. A continuación se detallan los puntos antes mencionados:

Tabla 4-2. Puntos aptos para muestreo de metales pesados.

UBICACIÓN (X, Y)	DESCRIPCIÓN	ESTRÉS
708174, 1356553	Cerro la Sompopera, sitio de Extracción Minera utilizan Mercurio, además existen túneles de 300metros de fondo.	Oro-Mercurio
709558, 1357071	Cooperativa de pequeños Mineros, contaminación directa con materiales pesados al río Artiguas.	Oro-Mercurio
709929, 1355565	Basurero Municipal y minería, contaminación por escorrentía hacia el río Artiguas.	Oro-Mercurio
709246, 1355578	Rastra de Cañón, contaminación por escorrentía ubicada cerca del basurero	Oro-Mercurio
708636, 1356006	Rastro Municipal, contaminación directa al río Artiguas.	Oro-Mercurio
708316, 1356073	Rastra Pancasán, afecta directamente la quebrada El Berrinche.	Oro-Mercurio

Con respecto a las muestras específicas la distribución y selección del número de puntos de muestreo debe basarse en la hipótesis de distribución espacial de la contaminación potencial en el emplazamiento, partiendo del modelo conceptual desarrollado durante las etapas de obtención de información preliminar, así como en los objetivos del estudio (EPA 2003, ISO/CD 11466).

Para el caso específico de la presente investigación se determinan los puntos de muestreo según la frecuencia y el grado de exposición que tengan estos espacios a los metales pesados, así mismo se pretende evaluar la distribución espacio-temporal del contaminante tomado tres sub muestras, una superficial, una de profundidad y una de distribución horizontal.

#### 4.5. Métodos e instrumentos de recolección de datos

Secuencialmente los métodos e instrumentos de recolección de datos se mencionan a continuación:

- Recolección de muestras o muestreo de relaves en puntos críticos de disposición de relaves del municipio de Santo Domingo.
- Los métodos o técnicas de Recolección de datos de pruebas de lixiviación se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 4-3. Técnicas de recolección de información

Técnica de recolección de información	
% de Metal Lixiviado de la muestra por hongo autóctono.  Concentraciones de metales en el lixiviado y Concentración inicial en muestra (mg/Kg-mg/L)  % de metal lixiviado de la muestra por hongo inoculado.  Concentraciones de metales en el lixiviado y Concentración inicial en muestra.	Análisis químico mediante uso de equipo ICP-OES
Taxonomía-Genómica	Técnica de Amplificación genética o Reacción en cadena de Polimerasa.

- Los datos obtenidos serán analizados mediante procedimientos estadísticos básicos.

#### 4.6. Procedimientos

Los procedimientos analíticos de cada parámetro o indicador de las variables se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 4-4. Procedimientos de obtención de datos de parámetros.

PARÁMETROS	PROCEDIMIENTOS
<b>pH</b>	Colocar una cantidad en gramos de suelo con cierto volumen en mL de agua destilada en frasco de determinado volumen. Dejar equilibrar por 10 minutos y medir con un electrodo de pH.
<b>Cantidad de sustrato.</b>	Colocar una cantidad en gramos de sustrato utilizando una balanza analítica.
<b>Temperatura.</b>	Conductivímetro de campo.
<b>Producción ácidos orgánicos</b>	Determinación mediante uso de HPLC
<b>Tiempo de percolación.</b>	Se determina el tiempo transcurrido de percolación utilizando un cronómetro de precisión.
<b>Concentración de metales pesados.</b>	Determinación de concentraciones de metales pesados dando tratamiento a las muestras con agua regia y mediciones con el ICP-OES

## 5. Cronograma de Actividades

		Actividades	Tiempo																	
No.	Etapa		Mayo	Junio	Julio	Agosto	Octubre	Noviembre	Diciembre											
1	Pre	Idea																		
2		Solicitud a Institución Biotecnología	■																	
3		Revisión bibliográfica preliminar		■																
4		Planteamiento de Problema			■															
5		Elaboración de Objetivos				■														
6		Redacción de Justificación					■													
7		Marco teórico					■	■	■	■										
9		Experimento	Pruebas de optimización de percolación								■									
10	Muestreo										■	■								
11	Análisis químicos preliminares												■	■						
12	Montaje de equipo de													■						



- Gadd, G. M. (1999). Fungal Production of Citric and Oxalic Acid: Importance in Metal Speciation, Physiology and Biogeochemical Processes. *Advances in Microbial Physiology* , 47-92.
- Gadd, G. M. (2004). Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma* , 109-119.
- Hernandez Hernandez, A. (Junio de 2011). *Tesis: Determinacion de metales pesados en suelos de natividad*. Recuperado el 12 de Agosto de 2013, de Sitio web de Universidad de Sierra Juarez:  
<http://www.unsij.edu.mx/tesis/digitales/4.%20ADELA%20HERNANDEZ%20HERNANDEZ.pdf>
- Hernandez Sampieri, R., Fernandez Collado, C., & Baptista Lacayo, M. d. (2010). *Metodología de la Investigación* (Quinta edición ed.). Mexico D.F: McGraw-Hill.
- Chavarría, J. (2012).Proceso artesanal de oro. (R. Midence: Entrevistador) La Libertad, Chontales,Nicaragua.
- Löser, C., Seidel, H., Hoffman, P., & Zehnsdorf, A. (2000). Remediation of heavy metal-contaminated sediments by solid-bed bioleaching. *Environmental Geology* , 643-650.
- Maksaev, V. (2009). *Impacto ambiental de la actividad minera*. Recuperado el 8 de Agosto de 2013, de Centro de computo de Universidad de Chile:  
<http://www.cec.uchile.cl/~vmaksaev/IMPACTO%20AMBIENTAL%20DE%20LA%20ACTIVIDAD%20MINERA.pdf>
- Ortiz, I., Sanz García, J., Dorado Valiño, M., & Villar Fernandez, S. (2008). *Informe de vigilancia tecnologica: Tecnicas de Recuperacion de suelos contaminados*. Madrid: Madridmas.
- Picado, F., Mendoza, A., Cuadra, S., Barmen, G., Jakobsson, K., & Bengtsson, G. (2010). Ecological, Groundwater, and Human Health Risk Assessmente in a Mining Region of Nicaragua. *Risk Analysis* , 916-933.
- Puga, S., Sosa, M., Lebgue, T., Quintana, C., & Campos, A. (2006). Contaminación por metales pesados en suelo provocada por la industria minera. *Ecología Aplicada* , 149-155.
- Santhiya, D., & Ting, Y.-P. (2006). Use of adapted *Aspergillus niger* in the bioleaching of spent refinery processing catalyst. *Journal of Biotechnology* , 62-74.
- Seidel, H., Ondruschka, J., Morgenstern, P., Wennrich, R., & Hoffmann, P. (2000). Bioleaching of heavy metal-contaminated sediments by indigenous *Thiobacillus* spp: metal solubilization and sulfur oxidation in the presence of surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology* , 854-857.
- Shinner, F., & Klauser, T. (2005). Feasibility Studies for Microbial Remediation of Metal-Contaminated Soil. En R. Margesin, & F. Shinner, *Manual for Soil Analysis-Monitoring and Assessing Soil Bioremediation* (págs. 155-159). Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

7. ANEXOS



Ilustración 7-1. Área de estudio.