



DESARROLLO DE MICROECONOMÍAS REGIONALES EN LA PRODUCCIÓN DE ACEITES ESENCIALES COSECHADOS EN SUELOS MINEROS - ATN/RF 16110

Producto 11: Informe sobre perfil microbiológico de los suelos remediados en cada una de sus fases

Juliana Arcila Galvis
Tatiana Arias Garzón
Darly Cañas Hoyos
Héctor Rodríguez Cabal



2021



Códigos JEL: Q16

FONTAGRO (Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria) es un programa de cooperación administrado por el Banco Interamericano de Desarrollo (BID), pero con su propia membresía, estructura de gobernabilidad y activos. Las opiniones expresadas en esta publicación son de los autores y no necesariamente reflejan el punto de vista del Banco Interamericano de Desarrollo, FONTAGRO, de sus Directores Ejecutivos ni de los países que representan.

El presente documento ha sido preparado por Juliana Estefanía Arcila Galvis, Tatiana Arias Garzón, Darly Cañas Hoyos, Héctor Alejandro Rodríguez Cabal.

Copyright © 2021 Banco Interamericano de Desarrollo. Esta obra se encuentra sujeta a una licencia Creative Commons IGO 3.0 Reconocimiento-NoComercial- SinObrasDerivadas (CC-IGO 3.0 BY-NC-ND) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/igo/legalcode>) y puede ser reproducida para cualquier uso no comercial otorgando el reconocimiento respectivo al BID. No se permiten obras derivadas. Cualquier disputa relacionada con el uso de las obras del BID que no pueda resolverse amistosamente se someterá a arbitraje de conformidad con las reglas de la CNUDMI (UNCITRAL). El uso del nombre del BID para cualquier fin distinto al reconocimiento respectivo y el uso del logotipo del BID no están autorizados por esta licencia CC-IGO y requieren de un acuerdo de licencia adicional. Note que el enlace URL incluye términos y condiciones adicionales de esta licencia.

Esta publicación puede solicitarse a:

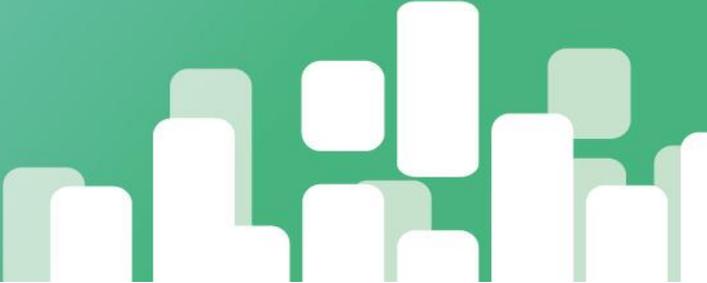
FONTAGRO

Correo electrónico: fontagro@fontagro.org

www.fontagro.org



Tabla de Contenidos



Resumen 4

Introducción..... 5

Objetivos..... 7

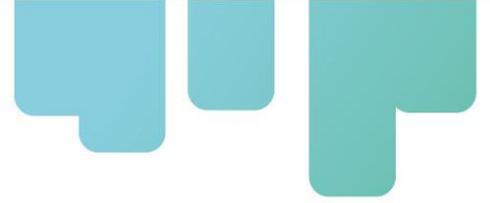
Metodología 8

Resultados 13

Discusión..... 29

Conclusiones 32

Referencias Bibliográficas 33

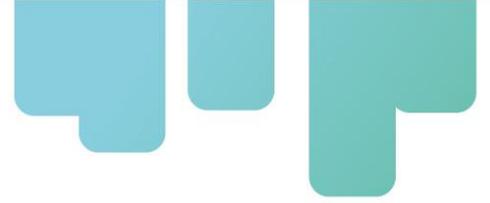


Resumen

La presente actividad que está enmarcada del proyecto que busca fortalecer las microeconomías regionales con beneficio a pequeños productores de especies aromáticas y aceites esenciales de Argentina y Colombia, incrementando la productividad y sostenibilidad de sus sistemas productivos, su capacidad técnica y organizativa, el aprovechamiento de materia prima y manejo empresarial, en el marco de la fitorremediación de suelos mineros. Para lo cual es importante conocer la abundancia y diversidad de microorganismos presentes en dichos suelos. Para esto se realizaron muestreos en la zona a tres niveles (bosque= BOS; botadero inactivo top= BIT; Botadero inactivo= BIM). Se realizaron un total de 60 extracciones de ADN de las muestras tomadas en la mina. Dichas muestras se amplificaron para 16S e ITS, y se mandaron a secuenciar. Los resultados permitieron determinar 1740 géneros de bacterias y 817 especies de hongos que representan un número significativo de microorganismos identificados. Dentro de las familias más abundantes de bacterias se identificaron Burkholderiaceae, Ruminococcaceae, Lachnospiraceae, Micromonosporaceae. Así mismo, dentro de los géneros más representativos para hongos estuvieron *Fusarium*, *Aspergillus*, *Hypoxylon*, *Curvularia* y *Trichoderma*. El estudio realizado en los suelos mineros en proceso de restauración permitió determinar que los procesos realizados con las plantas aromáticas y la fertilización aplicada mejoraron la diversidad de microorganismos reflejando un proceso de sucesión que permitirá el futuro uso del suelo para la agronomía.

Palabras Clave:

Metagenómica, secuenciamiento masivo, 16S, ITS, DADA2.



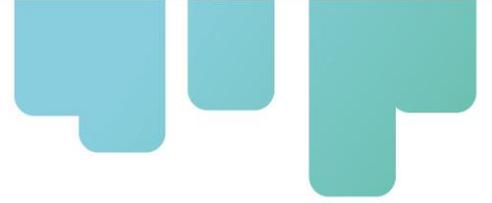
Introducción

El carbón es uno de los recursos energéticos más importantes en el mundo (Wu, et al 2019). Así mismo, la minería de carbón es una de las industrias centrales que contribuye al desarrollo económico de diversos países pero a su vez deteriora gravemente el medio ambiente (Tiwary, 2001), tales como la contaminación del aire, el aumento de la probabilidad de incendios, deformación de suelos, contaminación del agua, agotamiento de los recursos hídricos y pérdida de biodiversidad, adicionalmente se genera una afectación de actividades agrícolas debido a que se crea una competencia por la utilización de los suelos (Younger, 2004), por esta razón se convierte en un desafío realizar una minería sostenible, que contemple la revegetación y la rehabilitación de áreas degradadas por actividades mineras (Gastauer, et al 2018).

En este sentido, la minería ha tenido un auge notable en el mundo en los últimos años debido al dinamismo de flujo de inversión que se ha logrado por parte empresas mineras internacionales, en la actualidad muchos países de América Latina se benefician del aumento de estos flujos (Cárdenas & Reina, 2008). En Colombia, en la última década se ha registrado un crecimiento significativo en el volumen y el valor de la producción de los bienes primarios y en particular en el sector minero y de hidrocarburos, afectando positivamente, y de manera importante el producto interno bruto (PIB), del país, con una participación promedio alrededor del 6,7 % (Martínez, 2012; Martínez & Aguilar, 2013).

En Colombia, dentro de una de las principales minas de carbón esta la Caypa, que viene operando desde el año 1990. El área de la concesión minera es de 300 Ha, se encuentra ubicada sobre rocas pertenecientes a la formación Cerrejón, la cual está compuesta predominantemente por roca y también por numerosos mantos de carbón mineral (Ruiz, et al 2018). La explotación del carbón se realiza mediante el sistema denominado minería a cielo abierto, la cual implica realizar una serie de operaciones que inician con el descapote de la cobertura vegetal. Posteriormente, cuando se llega a la roca sana e intacta se ejecuta la perforación y la voladura de roca, una vez se vuela la roca, se prosigue con la remoción de la roca fragmentada (material volado). A este material se le denomina estéril. El cargue del estéril se realiza con retro excavadoras y camiones mineros, los cuales una vez cargados, transportan el estéril hasta los sitios de disposición final, llamado botaderos de estéril (Ruiz, et al 2018).

Debido a este proceso, se hace importante que al final se evalúen el estado de los suelos de los botaderos y su posible rehabilitación. Es aquí donde el estudio de los microorganismos presentes en dichos suelos podría mostrar la eficacia de este proceso de rehabilitación adicionalmente pueden servir como un indicador de rehabilitación de la tierra. Para este objetivo, la metagenómica busca identificar los microorganismos presentes en una muestra de ecosistemas acuáticos, suelos agrícolas y minas, entre otros (Craig et al., 2009), que mediante otras técnicas



no se podrían identificar, aproximadamente el 99 % de los microorganismos presentes en ambientes naturales no pueden ser replicados in vitro con las técnicas tradicionales de cultivo (Ruiz & Rodarte, 2003). De esta manera, la metagenómica no solo sirve como herramienta para la evaluación y explotación de comunidades microbianas presentes en ecosistemas complejos en este caso los suelos mineros (Simon & Daniel, 2011), sino que permite el descubrimiento de nuevas moléculas de interés biotecnológico (Ávila & Quito, 2019).

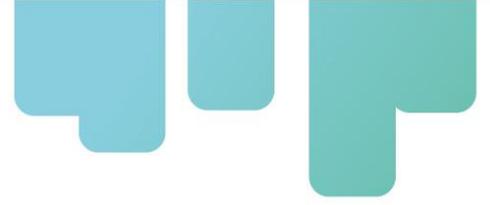
El presente trabajo está enmarcado en el proyecto “Desarrollo de microeconomías regionales en la producción de aceites esenciales cosechadas en suelos mineros”, que busca fortalecer las microeconomías regionales con beneficio a pequeños productores de especies aromáticas y aceites esenciales de Argentina y Colombia, incrementando la productividad y sostenibilidad de sus sistemas productivos, su capacidad técnica y organizativa, el aprovechamiento de materia prima y manejo empresarial, en el marco de la fitorremediación de suelos mineros. El presente trabajo corresponde a la actividad 2.7 en el marco de estudios metagenómicos del suelo a realizarse con la información de los tres primeros años de estudio y a entregarse el tercer año de investigación, esta actividad tiene como objetivo describir la biodiversidad de los microorganismos presentes en los suelos de los botaderos inactivos que se pretenden recuperar con la siembra de variedades de plantas aromáticas y el manejo del suelo. Lo cual permitirá tener un mejor conocimiento de los procesos que están ocurriendo en el suelo y plantear para el futuro nuevas opciones de manejo de este con microorganismos endémicos que se puedan haber adaptado a las condiciones de la región.



Objetivos

Dentro del marco del proyecto que busca fortalecer las microeconomías regionales con beneficio a pequeños productores de especies aromáticas y aceites esenciales de Argentina y Colombia, incrementando la productividad y sostenibilidad de sus sistemas productivos, su capacidad técnica y organizativa, el aprovechamiento de materia prima y manejo empresarial, en el marco de la fitorremediación de suelos mineros.

Con las actividades que se resolverán en este proyecto se planteó determinar el microbioma del suelo antes y después de la restauración de los suelos mineros, lo que permitirá establecer directamente el tipo de organismos que colonizan el suelo después de la restauración de los suelos.



Metodología

Descripción del lugar

El muestreo se realizó en la mina de carbón a cielo abierto “La Caypa”, ubicada en 11°3' N, 72°40' W en el departamento de Guajira al noreste de Colombia a 2,5 km del pueblo de Patilla cerca de la ciudad de Barrancas, dentro de la depresión Cesar-Ranchería. Esta mina cubre aproximadamente 300 hectáreas. El área es una llanura baja a unos 150 m de elevación, que consiste en pastizales de sabana y matorral disecado por los cursos de agua de la cuenca Cesar - Ranchería. La propiedad se encuentra en el área de producción de carbón Cerrejón y entre las propiedades se encuentra la mina a cielo abierto Cerrejón, la mina de carbón más grande de Sudamérica (Gráfico 1).

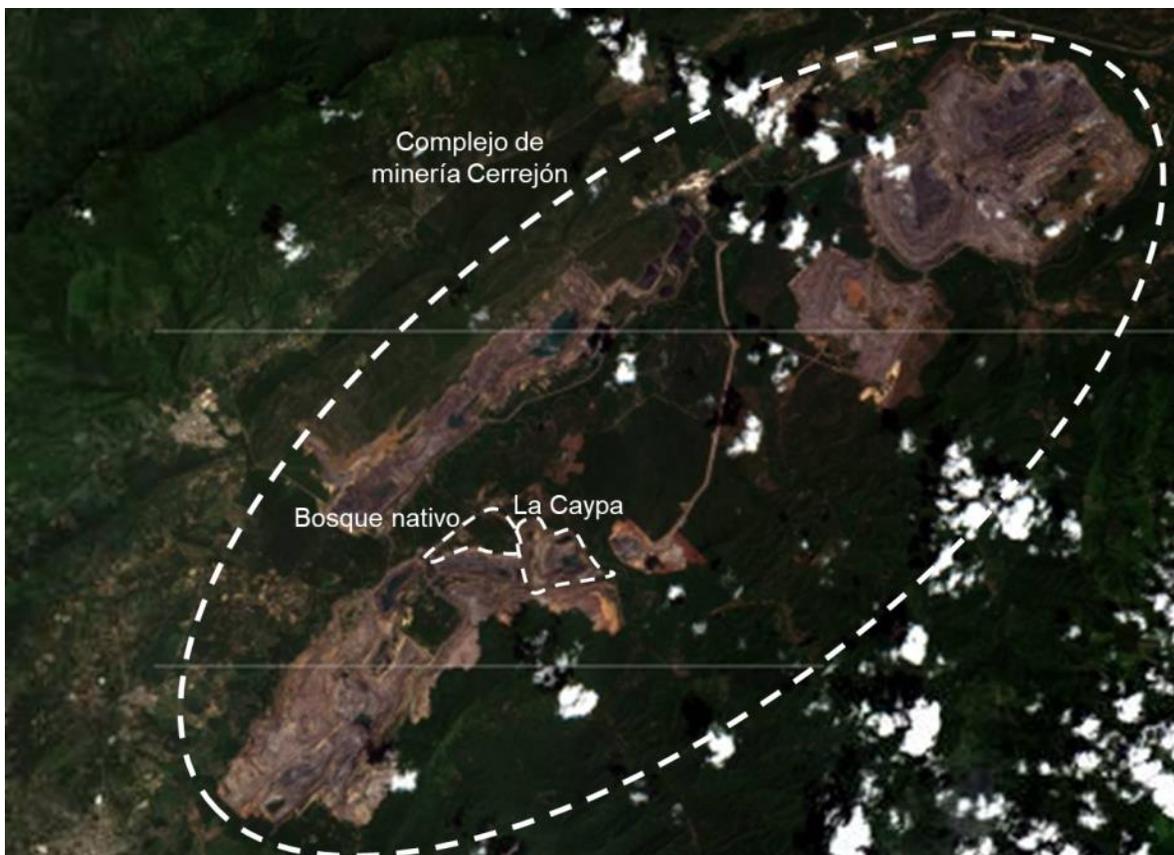
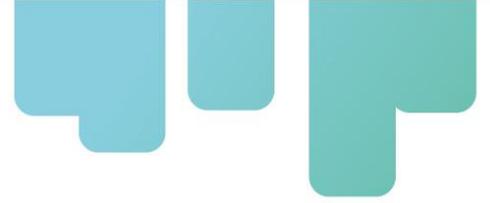


Gráfico 1. Imagen satelital obtenida por el satélite sentinel-2 el 5 de diciembre de 2017 donde se observa la localización de la mina La Caypa dentro del complejo del Cerrejón.



Dentro de la mina hay 5 grandes zonas definidas: La zona de oficinas y talleres, la zona de trabajo minero, la zona excavada que ha sido rellenada, el botadero sur en el que aún se está interviniendo y el botadero inactivo norte que se encuentra cerrado desde hace 9 años, que está dividido en 3 terrazas escalonadas que fueron sembradas con trupillo (*Prosopis juliflora*). En la terraza superior se aplicó un proyecto piloto con limoncillo (*Cymbopogon citratus*) desde 2018. Esta especie se cree fitorremediadora y es una de las especies que se estará utilizando en el proyecto para la producción de aceites esenciales de acuerdo con el modelo de los indígenas Kankuamos (Gráfico 2).

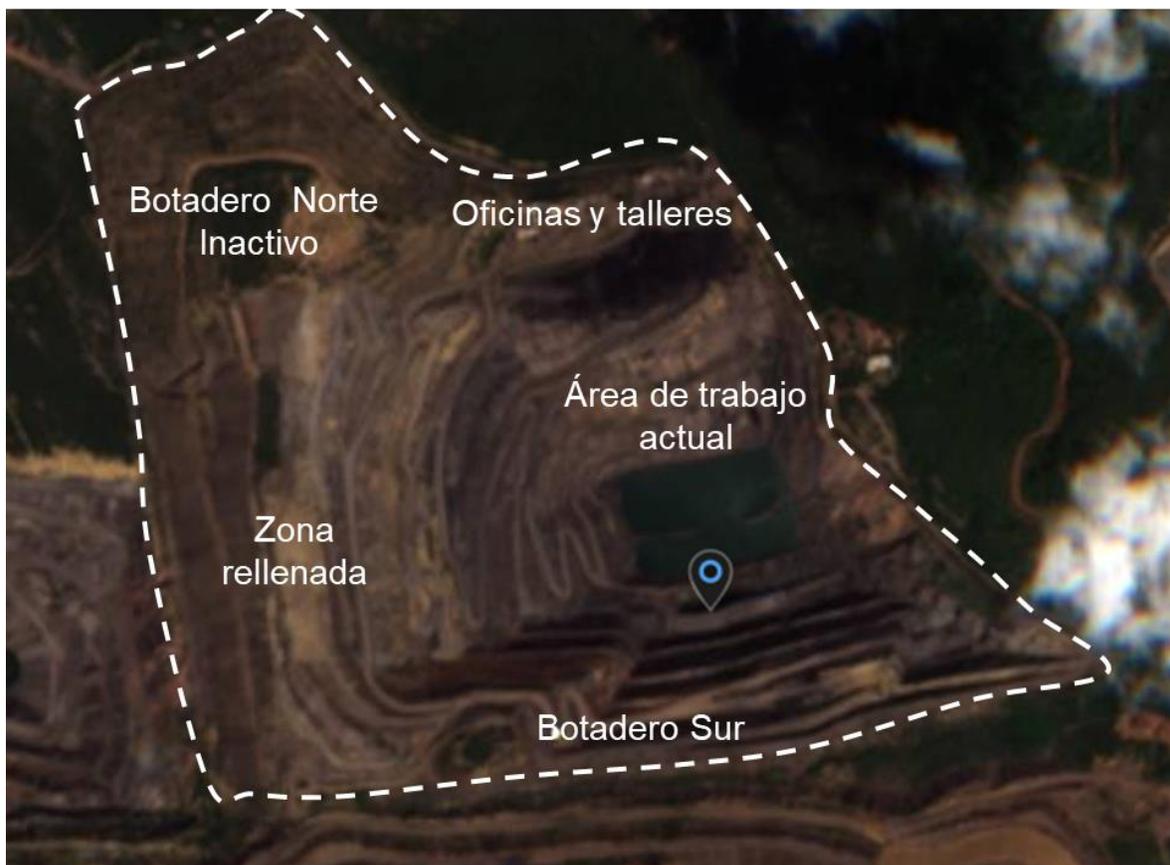


Gráfico 2. Plano del sitio

Diseño experimental de muestreo

Dado que el suelo dentro de cada tratamiento no es homogéneo y sus características fisicoquímicas pueden ser distintas y se observaron cambios en color y elevación, cada tratamiento fue dividido en 3 bloques de diferentes rangos de altura en el caso del botadero o profundidad en el caso de la mina. Se marcaron estas zonas de la siguiente manera: 1) Botadero



inactivo alto (BIT) 2) La zona del botadero inactivo medio (BIM), 3), El bosque nativo (BOS) (Gráfico. 3).

Cada tratamiento seleccionado fue muestreado en sus tres bloques en dos tiempos distintos, el primer muestreo se realizará en el febrero del año 2018 y el segundo muestreo en diciembre del 2019.

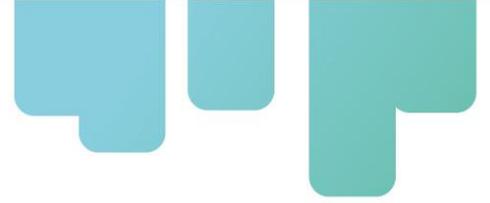


Gráfico 3. Diferentes niveles del botadero inactivo ubicado al norte de la mina.

De esta manera para análisis estadísticos posteriores se debe tener en cuenta que la variable independiente fue el tratamiento al que está sometido cada bloque y el tiempo en el que se realizó la colecta y las variables dependientes fueron los desenlaces o resultados de los análisis que se le realizaron a las muestras de suelo: diversidad, riqueza, concentración de metales pesados, etc.

Muestreo en cada bloque.

En cada bloque se dibujó un transepto (zig-zag) y sobre el zigzag se escogieron los puntos de la mitad del trazo (Gráfico 4). En cada punto seleccionado se dibujó una parcela circular con centro en el punto y diámetro 20 m. Se muestrearon cinco puntos, los puntos cardinales N, S, E, O y el centro de la parcela con un tubo hasta 10 cm de profundidad y 10 diámetro. De tal manera que de cada punto se recuperaron 3 kg de suelo. En total de cada cuadrante se deben obtener 15 kg de muestra de suelo. Para la muestra se tomaron los primeros 10 cm de suelo o en caso de que el suelo tuviera menos de 10 cm se tomó una muestra solo con el primer horizonte, teniendo



mucho cuidado de no contaminar la muestra con el segundo horizonte del suelo. Para estar seguro sobre el cambio de horizonte se puso especial interés al cambio de color en los horizontes del suelo, el primer horizonte debe ser siempre negro. Dentro del tratamiento (bosque, botadero inactivo, etc.), las muestras de suelo combinadas de un mismo bloque se tamizaron y homogenizaron en campo usando un colador no metálico para obtener una sola muestra compuesta por bloque. Cada tratamiento incluyó 3 réplicas biológicas, una por cada muestra compuesta de los tres bloques. Se obtuvo al final 6 muestras compuestas por estrato/tratamiento. Las muestras fueron tomadas y almacenadas en nevera con pilas de gel refrigerante de tal manera que se conserven hasta ser recibidas en el laboratorio de la Corporación para Investigaciones Biológicas en la ciudad de Medellín.

En cada punto de muestreo se debe medir la erosión, la pendiente, el área de vegetación versus área de suelo desnudo (cobertura vegetal), la cantidad de escorrentía que afecta el suelo (cuantos canales y profundidad de los canales), relación matriz-armazón, análisis de metales, oxidación de hierro (rojo), azufre o arsénico (amarillo), composición de elementos mayores y menores, minerales macroscópicos (pirita y cuarzo), granulometría y tamaño de grano.

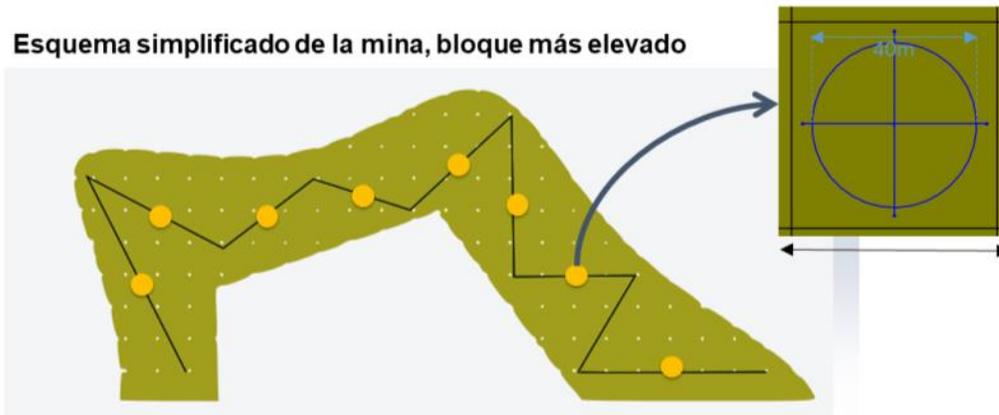
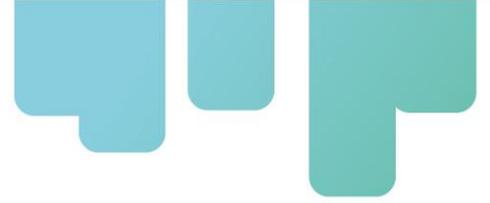


Gráfico 4. Ejemplo trazo de zig-zag con puntos de muestreo dentro de cada bloque, en este caso el bloque más elevado de mina activa. Detalle de las medidas de la parcela circular dentro de uno de los puntos seleccionados.

Purificación de DNA y secuenciamiento.

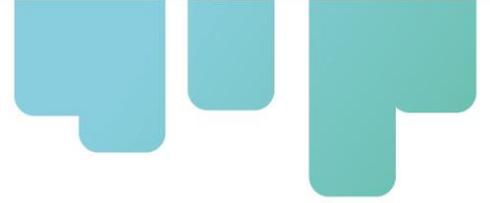
A partir de 250 mg de suelo de cada muestra, se realizó la extracción del ADN total usando el kit DNeasy PowerSoil (Qiagen, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de ADN fueron cuantificadas usando un nanodrop 2000. Las muestras purificadas de ADN que pasaron los criterios de calidad fueron seleccionadas para ser enviadas a secuenciar. Las muestras del primer secuenciamiento fueron enviadas a la empresa BGI genomics, mientras que las segundas



muestras fueron enviadas a la High-Throughput Sequencing Facility (HTSF) de la Universidad de Carolina del Norte. En ambos casos se realizó una PCR para amplificar las regiones 16S e ITS usando los mismos juegos de cebadores. El secuenciamiento se realizó en un equipo MiSEQ con lecturas pareadas de 250 pb. Para el primer muestreo se analizaron 6 replicas en el 16S, sin embargo, se estableció que 3 replicas eran suficientes, lo que se tuvo en cuenta para el segundo muestreo.

Análisis Bioinformático.

Se realizó la comprobación del control de calidad mediante el programa FastQC que proporciona un conjunto de análisis que se pueden utilizar para tener una impresión rápida de cualquier problema con el conjunto de datos (Brown, Pirrung, M & McCue, 2017). Los cebadores de PCR se eliminaron usando el programa Trimmomatic que es una herramienta de recorte de lectura flexible para datos Illumina NGS (Bolger et al, 2014). Las secuencias fueron también filtradas por calidad. Si solo se eliminó una lectura del par, la otra también se descartó para mantener la naturaleza del extremo emparejado de las muestras. Luego, las secuencias se filtraron usando DADA2. La anotación taxonómica se llevó a cabo después de la eliminación de las quimeras utilizando la función assignTaxonomy usando el conjunto de la base de datos de 16S de referencia Silva versión 138.1 (Quast et al., 2012), y para las librerías de ITS se usó la base de datos UNITE versión 8.2. Los paquetes de R phyloseq y ggplot2 fueron implementados para realizar un análisis más detallado de los datos del microbioma. La función filterAndTrim de DADA2 con una tasa de error máxima de 2. Las secuencias trimadas fueron usadas para estimar la tasa de error (función learnErrors). Finalmente, a las secuencias se les elimino el ruido, se fusionaron, y las variantes fueron inferidos utilizando el algoritmo.



Resultados

Los muestreos se realizaron conforme a lo establecido en la metodología como se muestra en la tabla 1. Una parte de las muestras tomadas fueron enviadas para análisis fisicoquímicos de suelos, estos los datos fueron almacenados para posteriores análisis (Gráfico 5). La otra parte fue llevada al laboratorio para realizar las extracciones de ADN.

Tabla 1. Sitios muestreados y muestras seleccionadas.

NOMBRE	CÓDIGO	# MUESTRA	Químico	Textura	Plomo	Cadmio
BOTADERO INACTIVO TOP 1	BIT1	1	X	X	X	X
BOTADERO INACTIVO TOP 2	BIT2	2	X			
BOTADERO INACTIVO TOP 3	BIT3	3	X	X	X	X
BOTADERO INACTIVO TOP 4	BIT4	4	X			
BOTADERO INACTIVO TOP 5	BIT5	5	X			
BOTADERO INACTIVO TOP 6	BIT6	6	X			
BOTADERO INACTIVO 1	BIM1	7	X	X	X	X
BOTADERO INACTIVO 2	BIM2	8	X			
BOTADERO INACTIVO 3	BIM3	9	X	X	X	X
BOTADERO INACTIVO 4	BIM4	10	X			
BOTADERO INACTIVO 5	BIM5	11	X			
BOTADERO INACTIVO 6	BIM6	12	X			
BOSQUE 1	BOS1	13	X	X	X	X
BOSQUE 2	BOS2	14	X			
BOSQUE 3	BOS3	15	X	X	X	X
BOSQUE 4	BOS4	16	X			
BOSQUE 5	BOS5	17	X			
BOSQUE 6	BOS6	18	X			



Gráfico 5. Muestreo en zona de Bosque aleñado a los botaderos inactivos. A) Panorama general del bosque; B) Tipo de suelo; C y D) Metodología de toma de muestras.

Las muestras fueron analizadas en el laboratorio de suelos de Corpoíca en Bogotá, que además contemplaron análisis de metales pesados Fe, Zn, Cd y Pb. En términos generales se encontraron contenidos de sodio y sales (Conductividad eléctrica alta) que pueden dificultar el crecimiento de cualquier especie. Adicionalmente, pH alto y contenido de materia orgánica alta que no es común en la Costa Atlántica y contenidos altos de azufre. El contenido de plomo y cadmio se incrementa al aumentar la profundidad de explotación removiendo contenidos de plomo y cadmio de las rocas en la explotación. Se determinó una gran desigualdad y fallas estructurales entre los suelos de los botaderos inactivos (Gráfico 6 y 7), posiblemente debido al deterioro por erosión eólica y de vientos. Además, se evidenció una gran cantidad de especies vegetales que han ido colonizando estas zonas, y otras especies vegetales que han sido introducidas, encontrándose que según el índice de valor de importancia (IVI), en el bosque seco tropical del Proyecto minero Caypa las especies más importantes corresponden a Trupillo, Aromo, Yaguaro, Guácimo; con una diversidad de 7/10.



Grafico 6. Muestreo en botadero inactivo, se muestran fallas estructurales en la zona.

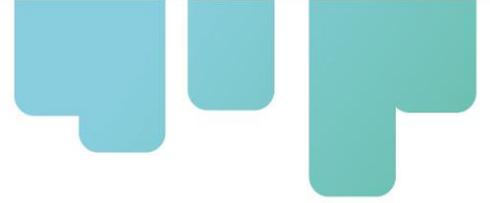


Grafico 7. Ubicación de botadero inactivo donde se aprecia desigualdad en suelos, y se tomaron muestras.

Por otra parte, la zona más baja y media del botadero presento una granulometría desde fina hasta gruesa, lo que genera capas muy permeables que conservan a su vez en gran medida el líquido esencial para el cultivo, pero para poder lograr altos índices de masa cultivada deben realizarse actividades que maximicen el drenaje intergranular de los suelos. El hierro que aparece en abundancia proviene de la formación Molino que se encuentra estratigráficamente dispuesta debajo de la formación superficial de la zona la cual está compuesta por concreciones Ferruginosas en arcillolitas las cuales al disgregarse y meteorizarse logran aportar esta capacidad a los materiales que propiamente luego se llevan a los botaderos.

Para el primer muestreo se realizaron 60 extracciones de ADN y para el segundo muestreo se realizaron 40 de extracciones de ADN (Gráfico 8), se seleccionaron las muestras que presentaron las mayores concentraciones de ADN y buena calidad, necesaria para ser secuenciadas (Tabla 2), en las muestras del botadero inactivo se determinó una gran cantidad de contaminantes como era de esperarse que afectaron la eficiencia de la extracción, sin embargo, se seleccionaron las mejores muestras y se enviaron a los centros de secuenciamiento para el proceso de amplificación por 16S e ITS, para posterior secuenciamiento.

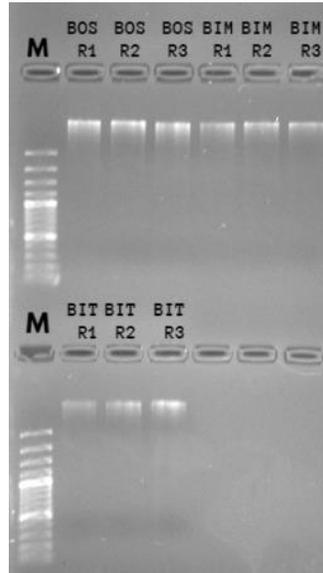


Gráfico 8. Foto de muestras de ADN extraído de los suelos en estudio. BIM= botadero inactivo; BIT= Botadero Inactivo Top; B= bosque; R1 = replica 1; R2= replica 2; R3= replica 3.

Tabla 2. Resultados de purificación del DNA y su respectiva cuantificación. BIM= botadero inactivo; BIT= Botadero Inactivo Top; BOS= bosque.

Muestras	260/290	260/230	Concentración		
			Nanodrop	Qubit	
BIM_R1	1,47	1,81	20,3 ng/uL	38 ug/mL	Presencia de contaminantes
BIM_R2	1,35	1,71	19,0 ng/uL	30 ug/mL	
BIM_R3	1,37	1,42	19,6 ng/uL	31 ug/mL	
BIM_R4	1,37	1,51	29,7 ng/uL	59 ug/mL	
BIM_R5	1,44	1,21	39,7 ng/uL	80 ug/mL	
BIM_R6	1,39	1,09	25,7 ng/uL	50 ug/mL	
BIT_R1	1,80	0,83	11,3 ng/uL	22 ug/mL	Muestras con DNA de mala calidad y baja concentración
BIT_R2	1,86	1,74	112,6 ng/uL	554 ug/mL	
BIT_R3	1,84	1,57	119,0 ng/uL	381 ug/mL	
BIT_R4	1,87	1,73	91,1 ng/uL	197 ug/mL	
BIT_R5	1,85	1,80	263,0 ng/uL	640 ug/mL	
BIT_R6	1,86	1,02	22,5 ng/uL	61 ug/mL	
BOS_R1	1,89	1,75	53,5 ng/uL	125 ug/mL	Muestras con buena calidad y concentración
BOS_R2	1,92	1,91	92,2 ng/uL	324 ug/mL	
BOS_R3	1,90	1,81	71,1 ng/uL	180 ug/mL	
BOS_R4	1,88	1,54	72,5 ng/uL	224 ug/mL	
BOS_R5	1,73	1,65	105,7 ng/uL	274 ug/mL	
BOS_R6	1,71	1,66	86,8 ng/uL	250 ug/mL	

Si bien algunas de las muestras no tuvieron los mejores estándares de calidad, igual las PCRs revelaron que no tenían contaminantes que inhiban las mismas. Los resultados del



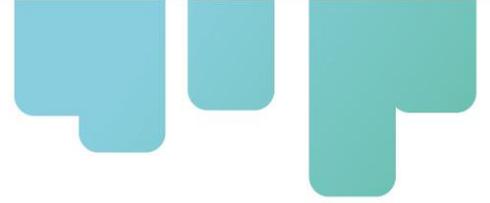
secuenciamiento evidenciaron entre 1,7 M a 2,6 M lecturas para las primeras muestras (Tabla 3), a partir de estos resultados se identificó que con alrededor de 1.2 M era una profundidad suficiente para establecer los resultados. Para el muestreo de ITS se tuvieron lecturas alrededor de 1.9 M para el primer muestreo y para el segundo muestreo se tuvieron muestras entre 755.550 a 377.119 (Tabla 4).

Tabla 3. Lecturas resultantes de los secuenciamientos para las muestras de 16S. BIM= botadero inactivo Medio; BIT= Botadero Inactivo Top; BOS= bosque.

Muestreo 1		Muestreo 2	
Muestra	# de lecturas	Muestra	# de lecturas
BIM_R1_16S	2.621.603	BIT_R4_16S	2.338.924
BIM_R2_16S	2.032.204	BIT_R5_16S	2.206.288
BIM_R3_16S	2.304.363	BIT_R6_16S	2.461.782
BIM_R4_16S	2.414.052	BOS_R1_16S	1.889.820
BIM_R5_16S	2.325.667	BOS_R2_16S	1.994.880
BIM_R6_16S	2.565.167	BOS_R3_16S	2.275.218
BIT_R1_16S	2.180.920	BOS_R4_16S	2.443.468
BIT_R2_16S	2.458.341	BOS_R5_16S	2.864.917
BIT_R3_16S	2.381.088	BOS_R6_16S	2.292.921

Tabla 4. Lecturas resultantes de los secuenciamientos para las muestras de ITS. BIM= botadero inactivo Medio; BIT= Botadero Inactivo Top; BOS= bosque.

Muestreo 1		Muestreo 2	
Muestra	# de lecturas	Muestra	# de lecturas
BIM_R1_ITS	1.863.775	BIM_R1_ITS	377.119
BIM_R2_ITS	1.988.997	BIM_R2_ITS	450.995
BIM_R3_ITS	1.738.552	BIM_R3_ITS	755.506
BIT_R1_ITS	2.290.119	BIT_R1_ITS	485.868
BIT_R2_ITS	2.250.337	BIT_R2_ITS	467.331
BIT_R3_ITS	2.483.338	BIT_R3_ITS	421.661
BOS_R1_ITS	1.814.563	BOS_R1_ITS	484.306
BOS_R2_ITS	1.964.470	BOS_R2_ITS	425.869
BOS_R3_ITS	1.988.997	BOS_R3_ITS	441.367



Las secuencias en general tuvieron un resultado de calidad aceptable y muy estable según electroforesis (Gráfico 8), lo que permitió empezar los flujos de procesamiento de las muestras. Se analizaron las lecturas con el programa FastQC para establecer la calidad mínima aceptable (Gráfico 9).

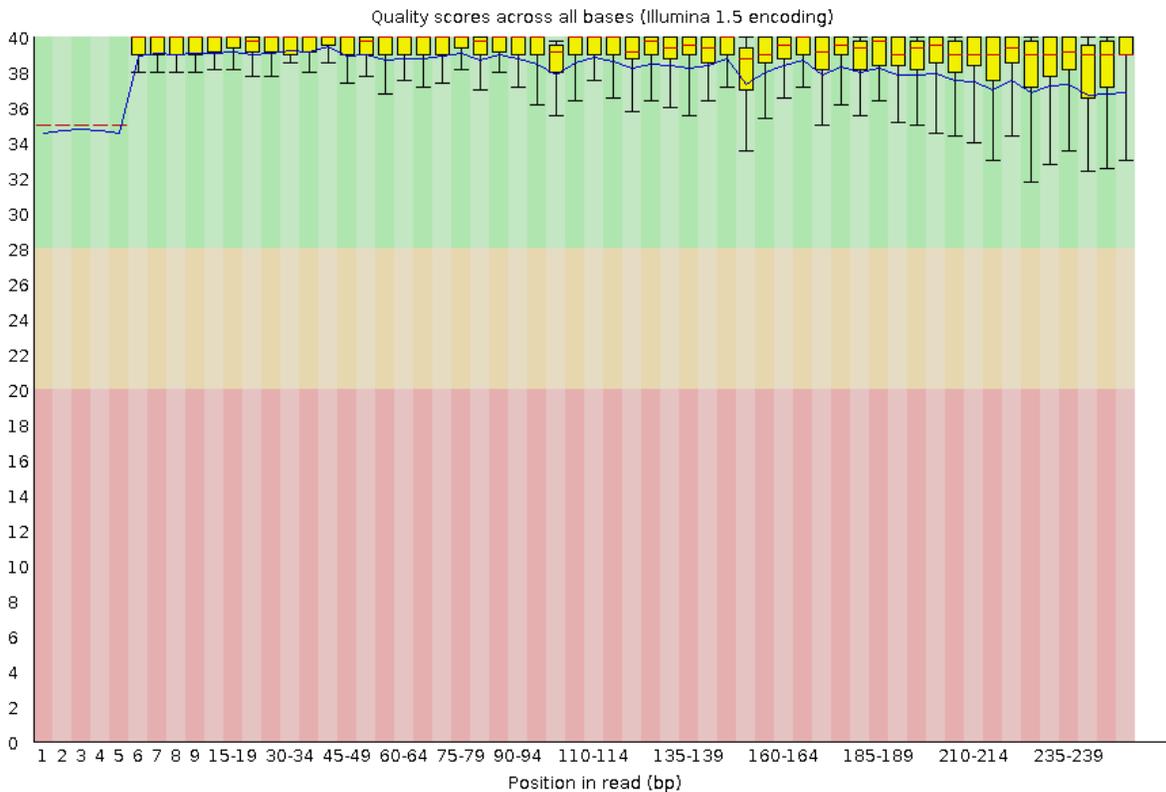


Gráfico 9. Resultados de análisis con el programa fastqc.

Los análisis de las muestras con el programa DADA2 permitió corregir errores de las secuencias en las muestras, así como establecer el número de secuencias únicas por muestra (Gráfico 10), el protocolo *merge* secuencias logro unificar las lecturas *forward* y *reverse*. Posteriormente, El método *core dada* corrige los errores de sustitución e indel, pero las quimeras permanecen. Afortunadamente, la precisión de las variantes de las secuencias después de la eliminación de ruido hizo que la identificación de ASV quiméricos fuera más sencilla que cuando se trata de OTU difusas. Las secuencias quiméricas se identificaron mediante la reconstrucción combinando un segmento izquierdo y un segmento derecho de dos secuencias "parentales" más abundantes.

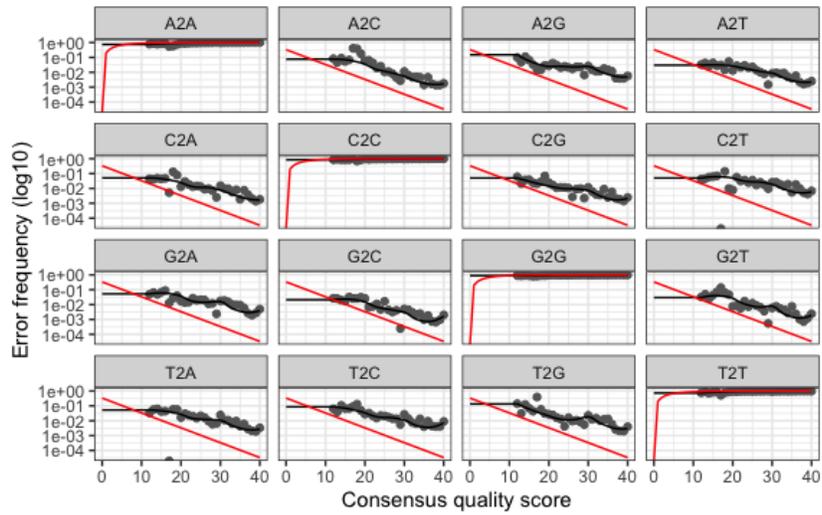


Gráfico 10. Resultados de análisis con el programa DADA2

Es común en este punto, especialmente en la secuenciación de amplicones 16S /ITS, asignar taxonomía a las variantes de secuencia. El paquete DADA2 proporciona una implementación nativa del método clasificador bayesiano para asignar taxonomía a las variantes de secuencia de los amplicones de 16S/ITS. La función *assignTaxonomy* tomó como entrada un conjunto de secuencias a clasificar y un conjunto de entrenamiento de secuencias de referencia con taxonomía conocida, y generó asignaciones taxonómicas. Los gráficos de enriquecimiento según Simpson mostraron que la diversidad entre las muestras por tratamiento agrupa a la mayoría de las réplicas, las medidas de diversidad alfa estuvieron entre 0,970 y 0,976 para 16S y 0,970 y 0,990 para ITS (Gráfico 11).

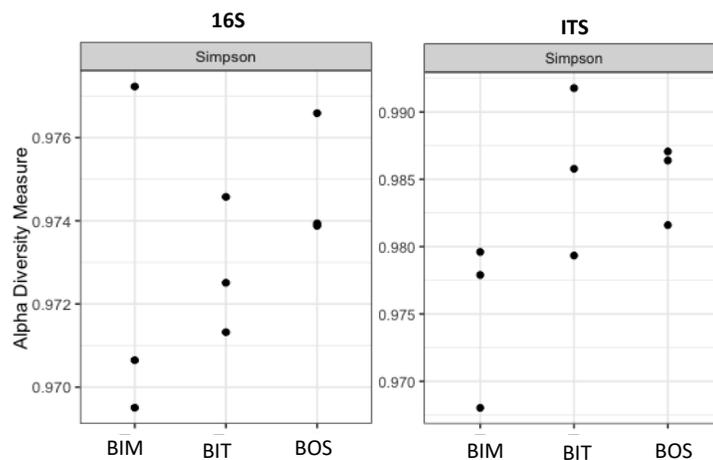


Gráfico 11. Plot de enriquecimiento que muestra la diversidad de las muestras según Simpson para 16S y para ITS, grafico obtenido mediante el programa phyloseq



Para los amplicones de 16S del primer muestreo se obtuvieron 57 filos para estos se asignaron 134 clases dentro de los que se asignaron 429 familias y 1740 géneros. Algunas de las familias más representativas fueron Burkholderiaceae, Ruminococcaceae, Lachnospiraceae, Micromonosporaceae con 50, 31, 26 y 25, también se identificaron otras familias tales como Thermoactinomycetaceae, Solibacteraceae_(Subgroup_3), Desulfobulbaceae, con 10, 8, y 7 géneros cada una (Gráfico 12).

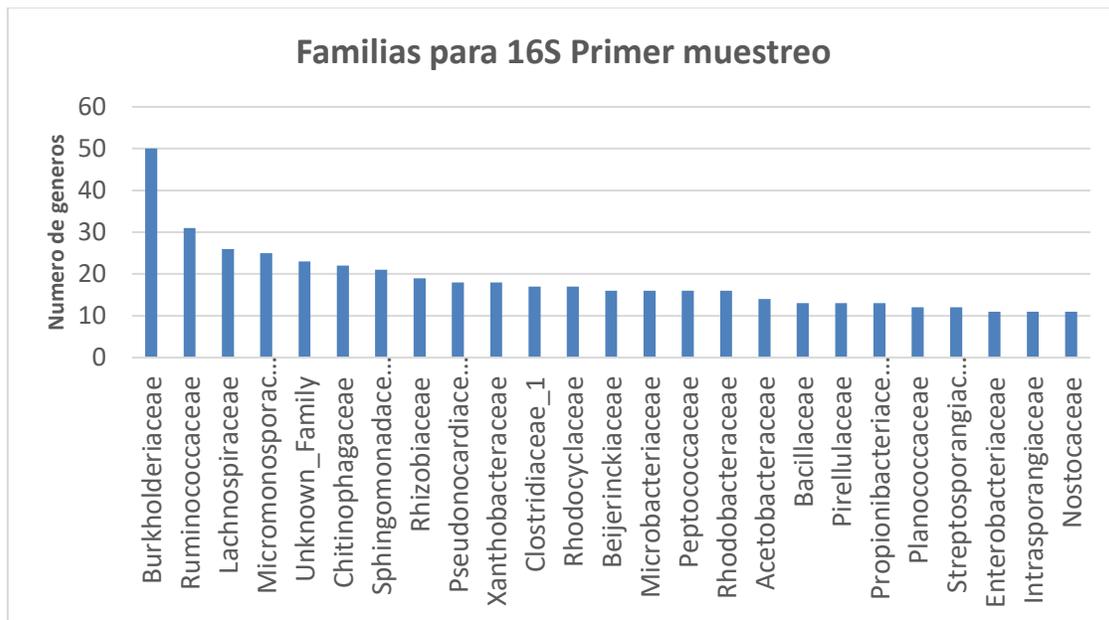


Gráfico 12. Número de géneros por familia que se asignaron a los amplicones de 16S para el muestreo 1.

En general, se identificó una menor abundancia de géneros asociados a las muestras del bosque, y una mayor abundancia en las muestras de Botadero Inactivo Top, especialmente los géneros Nitrocosmicus y Neorhizobium. Mientras que el género Steroidobacter presento mayor abundancia en las muestras del Bosque (Gráfico 13). Para el Botadero Inactivo Medio se determinó que el género Microvirga fue el más abundante.

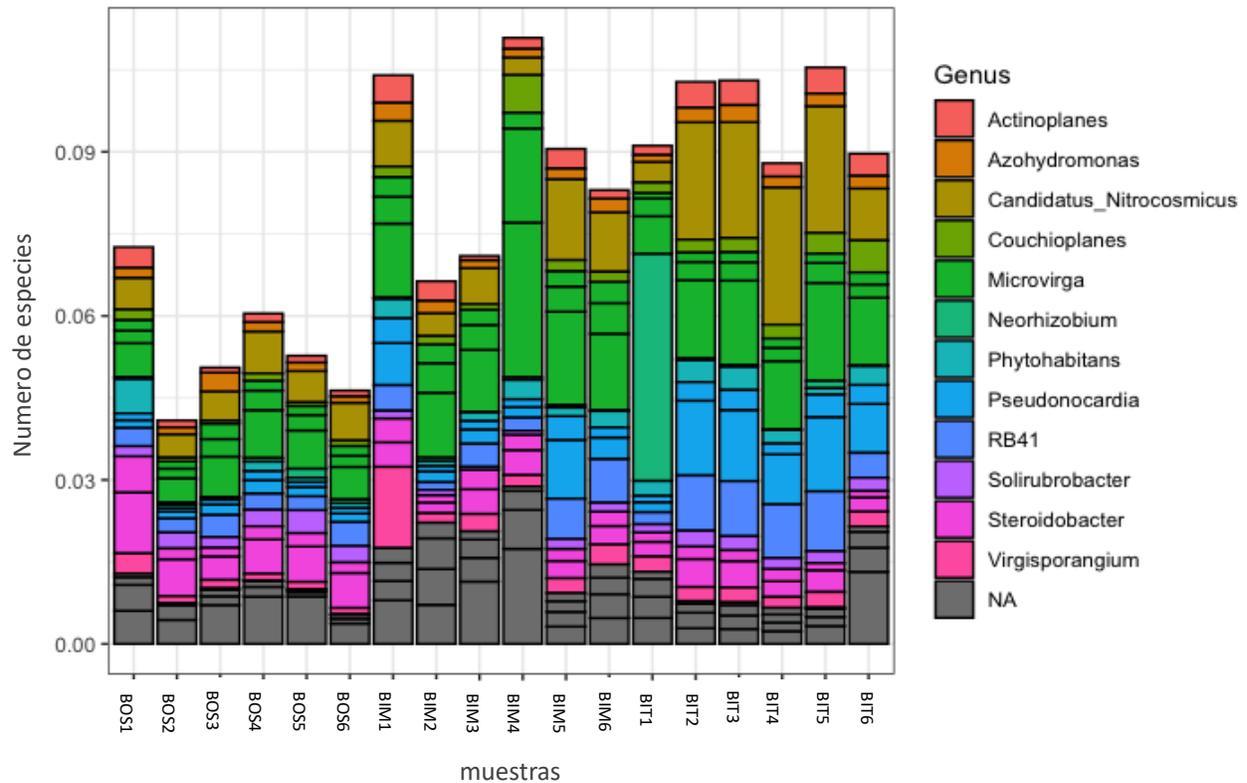


Gráfico 13. Plot en barras de la distribución taxonómica de los 20 géneros más abundantes para el segundo muestreo.

Para el segundo muestreo se identificó una disminución en la abundancia de algunas familias en comparación con el primer muestreo, especialmente, Burkholderiaceae, Ruminococcaceae, Lachnospiraceae, Micromonosporaceae, y otras que aumentaron tales como Gemmatimonadaceae, Pseudonocardiaceae, Gemmataceae y Phycisphaeraceae, que fueron especialmente altas en BIT y BIM en comparación con BOS (Gráfico 14).

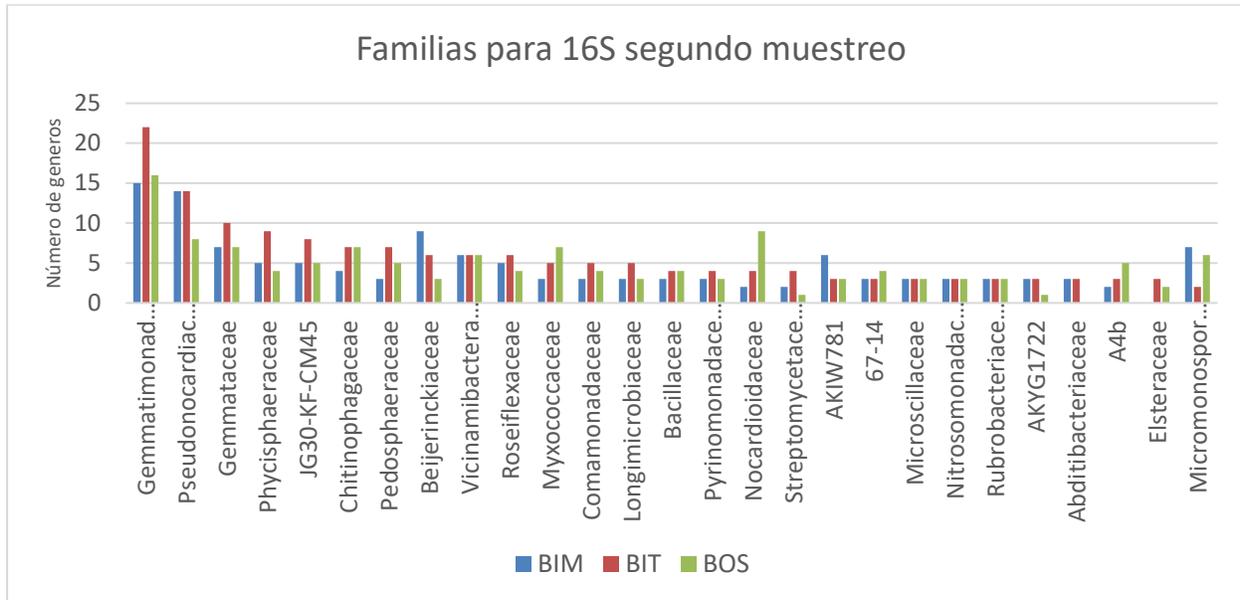


Gráfico 14. Abundancia de familias para 16S para segundo muestreo.

Para el segundo muestreo se observó que algunos de los géneros como Flindesiella, Solirubrobacter fueron más abundantes en las muestras de bosque, mientras que para Povalibacter, FFCG7168, Modestobacter, Aridibacter, Hymenobacter estuvieron presentes solo en BIM. Y los géneros RB41, Streptomyces, I-8, Krasilnkoviella fueron más abundantes en BIT (Gráfico 15).

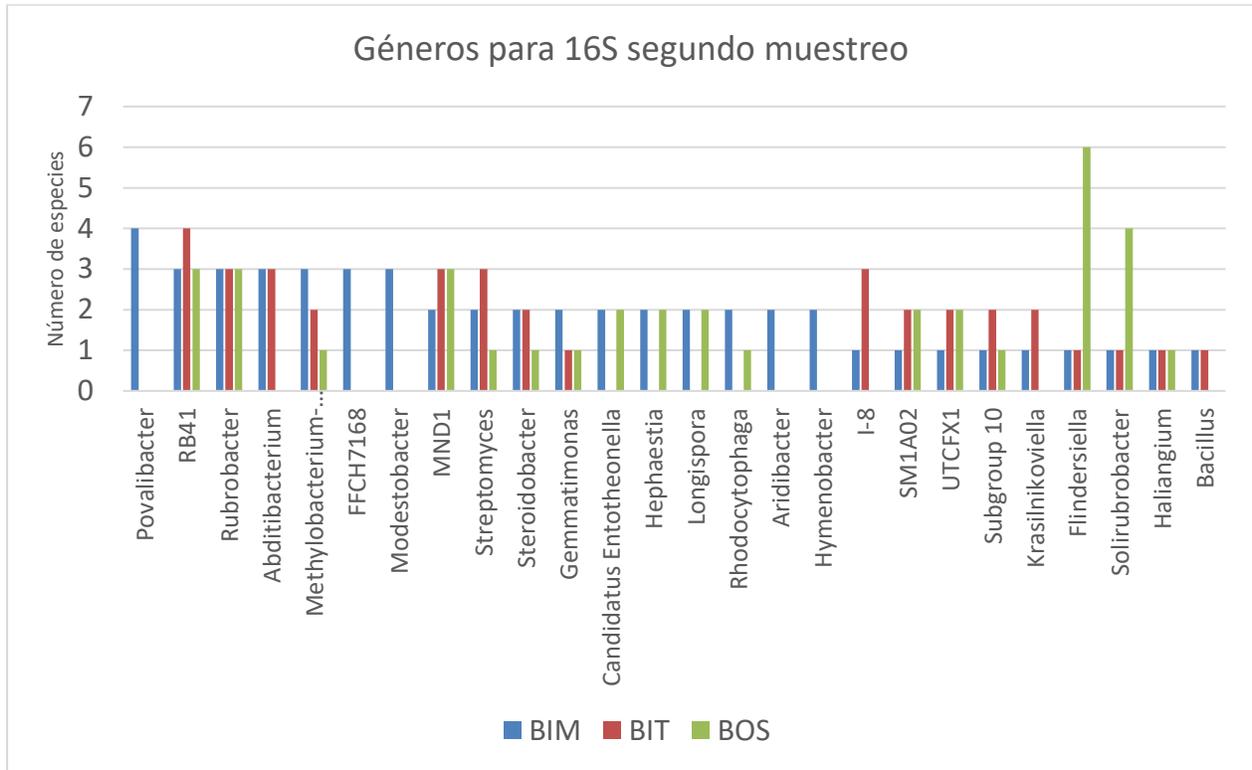


Gráfico 15. Géneros más abundantes para el segundo muestreo de 16S.

En el caso de los amplicones de ITS se obtuvieron 13 filas, para los que asignaron 39 clases, 88 órdenes, 195 Familias (Gráfico 16), 386 géneros, y 817 especies (Gráfico 17). De estas 817 especies, 119 no se pudieron establecer (NA), y dentro de los géneros más representativos estuvieron *Fusarium*, *Aspergillus*, *Hypoxylon*, *Curvularia* y *Trichoderma* con 17, 16, 12, 11 y 11 especies correspondientemente (Gráfico 17).

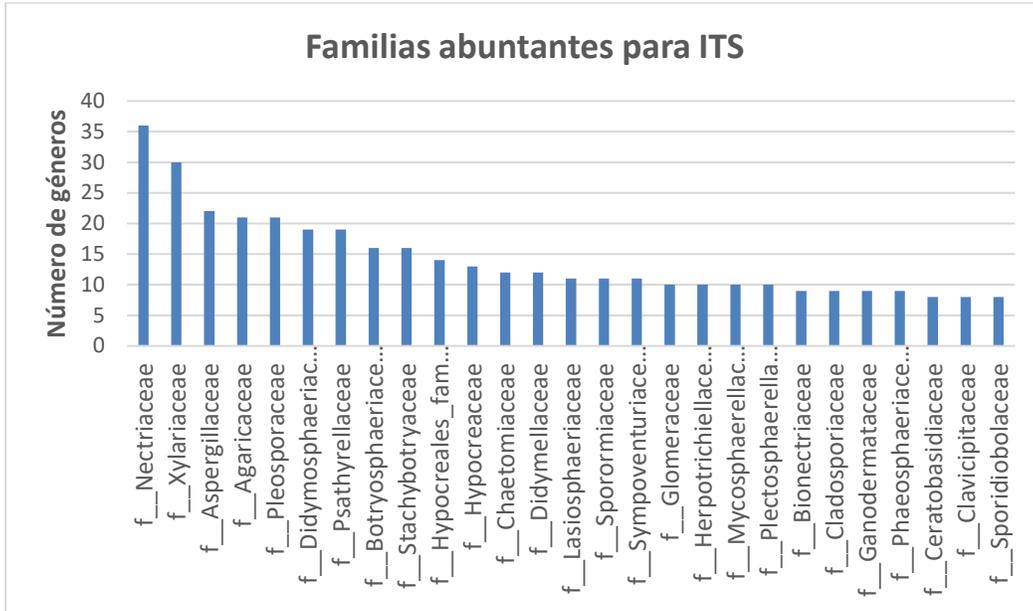


Gráfico 16. Número de géneros por familia que se asignaron a los amplicones de ITS

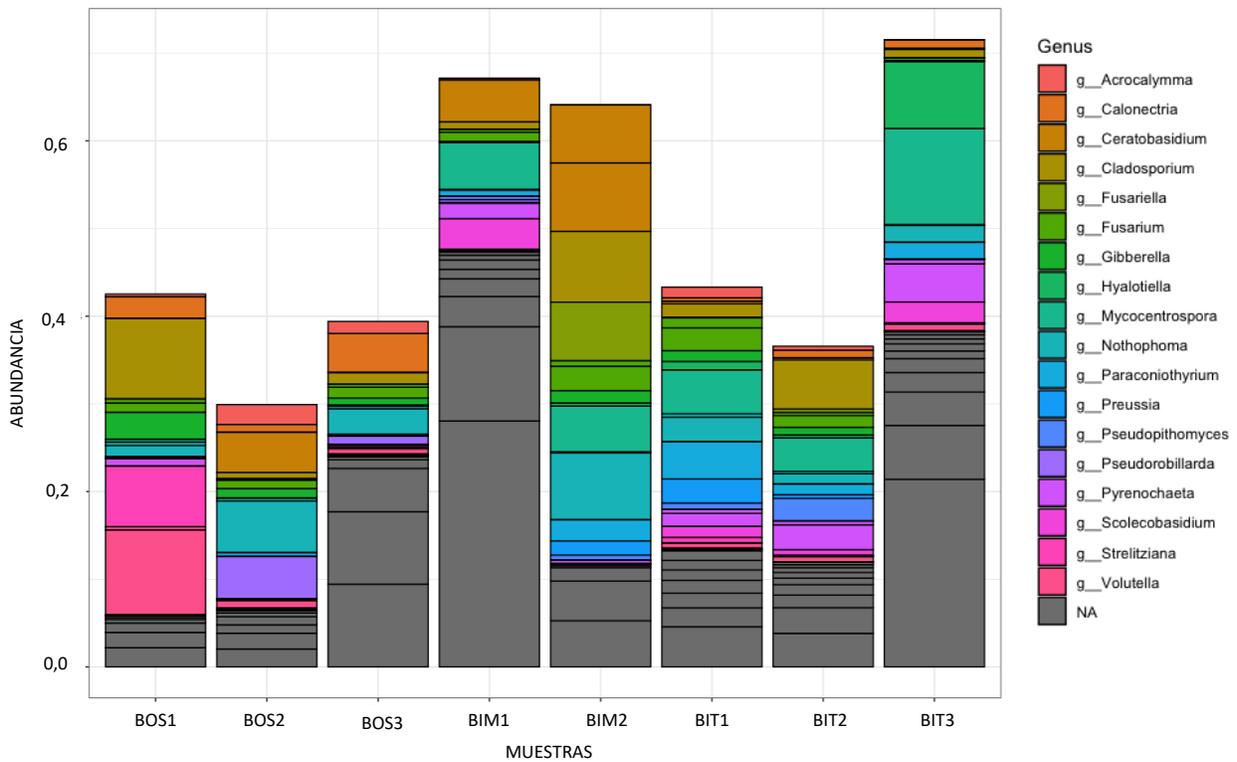
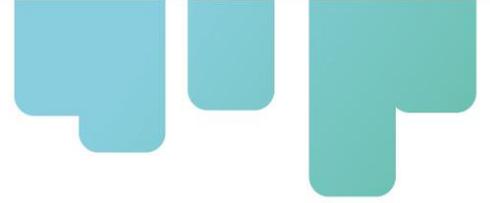


Gráfico 17. Número de especies por géneros que se asignaron a los amplicones de ITS



De los géneros más abundantes llama la atención los géneros *Fusarium* que son patógenos del suelo como lo es la especie *Fusarium oxysporum* y *F. Solani*, así mismo como el género *Trichoderma* que puede ser de interés para el análisis general del proyecto (Tabla 4).

Tabla 5. Géneros con mayor número de especies asignadas.

Géneros	Especies	Géneros	Especies
g__Aspergillus	NA	g__Curvularia	NA
	s__caespitosus		s__caricae-papayae
	s__eburneocremeus		s__ellisii
	s__granulosus		s__eragrostidis
	s__insuetus		s__intermedia
	s__intermedius		s__lunata
	s__karnatakaensis		s__pseudorobusta
	s__melleus		s__sorghina
	s__minisclerotigenes		s__spicifera
	s__pseudodeflectus		s__subpapendorffii
	s__puniceus		s__verruculosa
	s__quadrilineatus		NA
	s__subversicolor		s__anthochroum
	s__sydowii		s__calileguense
	s__tamarii		s__crocopeplum
s__westerdijkiae	s__fendleri		
g__Fusarium	NA	g__Hypoxyton	s__griseobrunneum
	s__acutatum		s__haematostroma
	s__albosuccineum		s__monticulosum
	s__buharicum		s__pulvicidum
	s__chlamydosporum		s__rubiginosum
	s__delphinoides		s__subdisciforme
	s__kelerajum		s__suranareei
	s__keratoplasticum		NA
	s__kurunegalense		s__caerulescens
	s__oxysporum		s__erinaceum
	s__penzigii		s__eucorticioides
	s__proliferatum		s__evansii
	s__pseudensiforme		s__longibrachiatum
	s__redolens		s__paucisporum
	s__sarcochroum		s__rifaii
s__solani	s__saturnisporum		
s__sublunatum	s__turrialbense		
		g__Trichoderma	s__virescentiflavum



Para el segundo muestreo En total se obtuvieron 187 familias distintas, repartidas entre los 3 tipos de muestras. Algunas de las familias más frecuentes fueron Aspergillaceae, Pezizomycotina, Chaetomiaceae y Glomeraceae para BIT, mientras que las más abundantes para BOS fueron Nectriaceae, Trichomeriaceae, Agaricaceae (Gráfico 18).

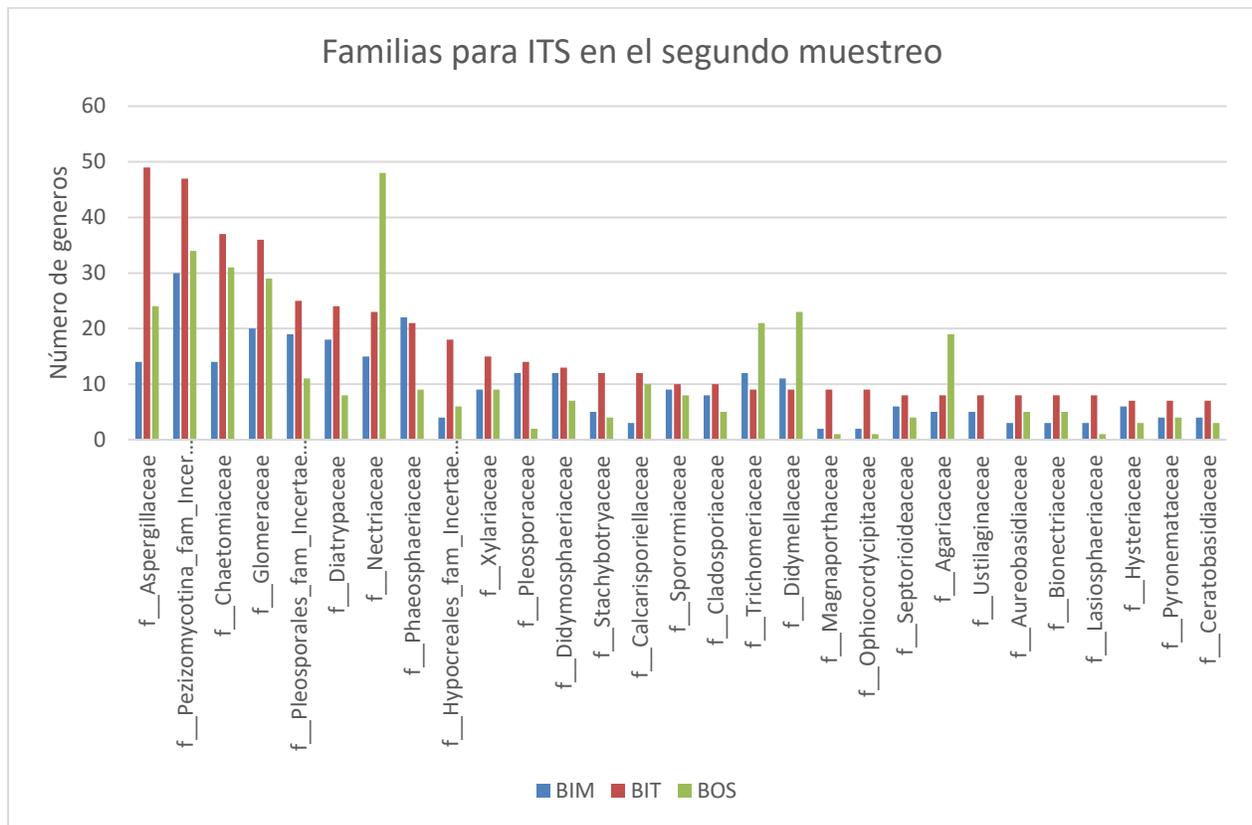


Gráfico 18. Número de géneros mas abundantes por familia que se asignaron a los amplicones de ITS en el segundo muestreo.

Para dicho muestreo también se obtuvieron 327 Géneros diferentes, entre los que resaltan los géneros Ciliophora y Aspergillus con la mayor cantidad de especies en las muestras, siendo significativamente más altas en BIT. También se resalta la aparición de especies patógenas tales como Fusarium, Cladosporium, Colletotrichum. Y Generos que pueden ser usados para bienestar entre estos esta Trichoderma, Ganoderma, Cordyceps, que han sido usados para el control biológico (Gráfico 19).

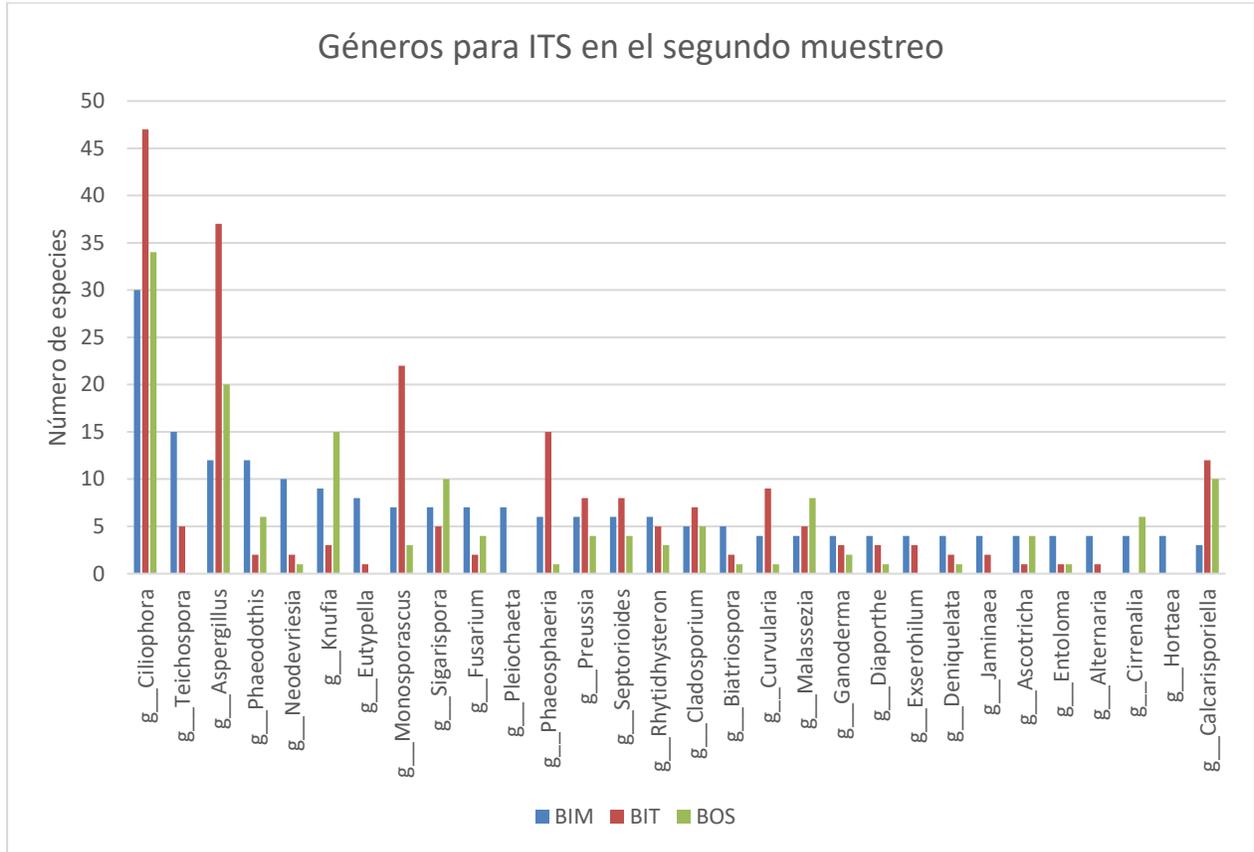
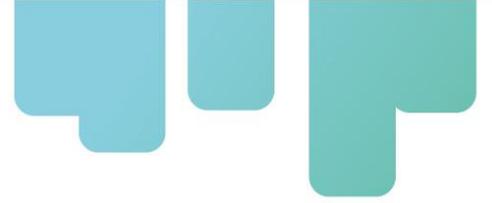


Gráfico 19. Géneros con mayor abundancia de especies entre las muestras de ITS para el segundo muestreo.

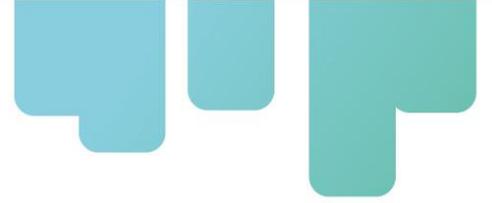


Discusión

El suelo se podría considerar como un sistema complejo que sirve de reservorio para una gran cantidad y biodiversidad de microorganismos. En este sentido, albergan un gran potencial genético para la degradación y transformación de compuestos orgánicos en el planeta (Nogales, 2005). Conocer este potencial mediante técnicas convencionales se ve muy limitado debido que un pequeño porcentaje de los microorganismos puede crecer y almacenar en medios artificiales (Torsvik & Øvreås, 2002), por otro lado, la metagenómica permite conocer la mayoría de microorganismos que estén en una muestra de suelo, estableciendo así la calidad del suelo y potencial del mismo en un proceso.

Evaluar las características físico-químicas de un suelo permite tener una idea del nivel de afectación del suelo, un ejemplo de esto es que al encontrar en las muestras altos contenidos de sodio y sales esto nos permite saber que la revegetación va a ser un poco difícil, teniendo en cuenta el impacto que estos pueden tener en el suelo y el nivel de estrés que pueden ocasionarle a una planta (Mata et al., 2014); otro parámetro que fue evaluado es la presencia de plomo y cadmio, en un suelo; tener estas dos condiciones elevadas resuelta en un peligro para la biota debido a su tendencia de acumulación y la biomagnificación a través de la cadena trófica además de tener efecto en la sobrevivencia de las plantas (Argota et al., 2014). Por otra parte, la metagenómica termina de darnos los datos necesarios para comprender las interacciones biológicas de una muestra y así tener los datos base para crear una estrategia de biorremediación, en general con las muestras obtenidas se obtuvieron aceptables índices de riqueza sin importar si era BIT, BIM o BOS; o 16S o ITS, esto refleja que a pesar de las condiciones que se manejan en una mina aún se mantiene diversidad en su biota. Esto también teniendo en cuenta a que los suelos de la Guajira colombiana son pobres en microorganismos, y que muchos de los trabajos que se realizan no logran cultivar muchos de los microorganismos, y por tal razón no son efectivos limitándose a algunos grupos tales como Proteobacterias, Cyanobacterias y algunas Eubacterias Gram positivas (Jaramillo, 2002).

Para un primer muestreo las familias más representativas fueron Burkholderiaceae, Ruminococcaceae, Lachnospiraceae, Micromonosporaceae. De estas, la familia Burkholderiaceae de acuerdo a trabajos realizados por otros investigadores se le ha determinado que tiene potencial de degradación de compuestos aromáticos generalmente contaminantes los cuales están presentes en una mina (Pérez et al., 2012). Recientemente, se realizó un trabajo para realizar la desinfección reductiva del suelo (RSD) para remediar suelos afectados, en este trabajo se observó la presencia de las familias Ruminococcaceae, Lachnospiraceae y Clostridiaceae, que

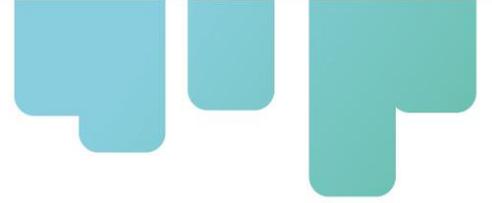


pertenecen a Clostridiales dentro del grupo Firmicutes, estas familias estuvieron fuertemente relacionadas con la disminución del pH durante la DSR (Xinqi et al., 2018), que se considera un indicador de la acumulación de ácidos grasos de cadena corta, estas familias se disminuyeron para el segundo muestreo realizado 12 meses después, posiblemente, reflejando un proceso de sucesión donde estas especies realizaron un primer proceso recuperación de los suelos ya que para el segundo muestreo los tres tipos de muestras tuvieron una abundancia similar. Para un segundo muestreo, también se evidenciaron nuevas familias como, Pseudonocardiaceae y Gemmatimonadaceae, esta primera genera gran interés biotecnológico al ser una familia productora de sustancias antibacterianas ante ambientes con contenido moderado o alto de nitrógeno (Gonza et al., 1998). Mientras que, el metabolismo de Gemmatimonadaceae es mayormente desconocido, pero se sabe que *Gemmatimonas aurantiaca* T-27T redujo significativamente el N₂O en presencia de oxígeno (Park et al., 2017). En este sentido Cardinale y col. (2020) mostraron una correlación de Gemmatimonadetes con fertilización orgánica + inorgánica. De igual manera nuestros resultados confirmaron una correlación de Gemmatimonadetes con la fertilización en el botadero inactivo alto (BIT).

Otros géneros interesantes en BIT, se identificó que Nitrocosmicus fue abundante, este género se asocia normalmente a la presencia de pesticidas posiblemente la presencia de estos este asociada a un transporte aluvial o eólico (Pérez, 2018), en las muestras de Bosque predominó Steroidobacter que tienen la capacidad de reducir nitratos a nitritos o nitrógeno (Huang et al., 2019) que son comunes en zonas de bosques (Peña et al., 2017) y finalmente en Botadero Inactivo Medio, se evidenció Microvirga un género asociados a suelos con capacidad de resistir altas temperaturas como a las que está sometida la mina (Kanso et al., 2003).

En cuanto a géneros en este segundo muestreo, Flindesiella, Solirubrobacter fueron más abundantes en las muestras de bosque, al ser el bosque un control era de esperarse que se mantuvieran sus géneros más abundantes similares en ambos muestreos, sin embargo, las condiciones ambientales entre muestreos pudieron haber cambiado, lo cual generó este resultado con géneros diferentes, en este sentido, Solirubrobacter es interesante al ser un género productor de pigmentos (Whitman, 2015). Mientras en BIM, Modestobacter es importante resaltarla ya que especies de esta pueden degradar alcohol polivinílico (Nogi et al., 2014) y otras son productoras de melaninas bajo oligotrofia (Reddy et al., 2007), y BIT donde Streptomyces fue encontrada; este género es muy conocido por ser el productor de antibióticos más grande del mundo microbiano descubierto hasta ahora, el cual es aislado normalmente de suelos (Watve et al., 2001).

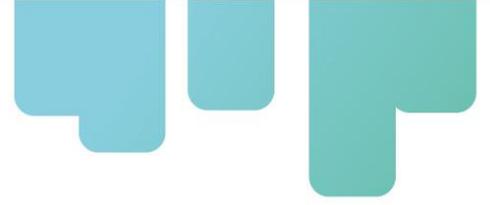
En el caso de los amplicones de ITS en el primer muestreo estuvieron presentes; El género Fusarium que es un grupo de hongos filamentosos ampliamente distribuidos en el suelo y plantas. Debido a su capacidad de crecer a 37 °C, son considerados patógenos oportunistas de plantas y humanos (Tapia & Amaro, 2014; Brown & Proctor, 2013); Aspergillus, es un grupo diverso muy abundante en el mundo patógeno oportunista (Krijgheld et al., 2013) tiene una considerable



importancia para la sociedad debido a la capacidad que presentan algunas de sus especies de producir enzimas y ácidos orgánicos (Gonzalez, 2010). Este género *Aspergillus* puede cambiar entre estilos de vida saprofitos y patógenos, y la producción de metabolitos secundarios, como las micotoxinas, puede variar de acuerdo con estos modos de vida fúngicos. Estudios recientes destacaron la compleja red ecológica de microbiotas del suelo que determina los nichos que *Aspergillus* puede colonizar (Walter et al., 2020). En el segundo muestreo, se observó que este género se mantuvo mucho más alto en BIT, en comparación con los otros sitios de muestreo.

Otro género fue *Trichoderma* que son ascomicetos transmitidos por el suelo que se pueden encontrar en todo el mundo. Han sido estudiados con respecto a diversas características y aplicaciones, como xilanasas con éxito en aplicaciones industriales como el preblanqueo de pulpas kraft (Wong & Saddler, 1992). Sin embargo, uno de los aspectos más relevantes del género *Trichoderma* es gracias a su eficacia para colonizar muchos tipos de raíces de plantas e inhibir los hongos que causan muchos tipos de enfermedades, razón por la cual ha sido uno de los primeros tipos de biofungicidas disponibles comercialmente (Schmoll & Schuster, 2010). Estos *Trichodermas* podrían ser interesantes para aislarse y re-aplicarse en el suelo, usando biocontroladores naturales, pero además acondicionado a las características de la zona (Druzhinina et al., 2011).

Finalmente, los amplicones de ITS para el segundo muestro se resaltan géneros diferentes entre los más importantes esta *Ganoderma* que es un género de hongos estudiado por sus características medicinales pero también por tener moléculas antifúngicas y antibacteriales (Baby, Johnson & Govindan, 2015), también ha sido utilizado en el tratamiento de cáncer y productor de componentes farmacológicamente activos más importantes como triterpenoides y los polisacáridos usados por su actividad antitumoral (Boh, Berovic, Zhang & Zhi-Bin, 2007).



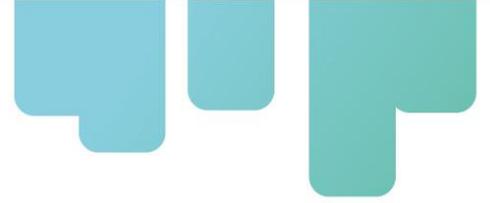
Conclusiones

Este informe presenta los resultados perfil microbiológico de suelos remediados de la mina la Caypa en Colombia. Los resultados obtenidos permitieron establecer 1740 géneros de bacterias y 817 especies de hongos que representan un número significativo de microorganismos identificados. Se identificaron géneros de hongos y bacterias que pueden ser interesantes teniendo en cuenta que están adaptadas a las condiciones del suelo, como es el caso de Trichoderma que en otras actividades se implementaron como solución para acelerar la recuperación de los suelos.

También se observa que los procesos adelantados con plantas aromáticas y con la fertilización del suelo han tenido un impacto positivo sobre el suelo, y presentan una alternativa viable para el manejo de los suelos después del cierre de espacios. Esto podría resultar en una importante mitigación de los impactos ambientales que se presentan no solamente en Colombia sino en Latinoamérica por la minería legal e ilegal que afecta miles.

Una de las conclusiones más importantes de la actividad es lograr identificar que los suelos mineros a pesar de los impactos, son capaces de realizar una sucesión de microorganismos que aporten nutrientes al suelo y ayuden a degradar los desechos del proceso minero, permitiendo más adelante reutilizar los suelos para la agricultura, permitiendo así fortalecer la capacidad comercial de la región.

Estos resultados también demuestran que las metodologías que se implementaron fomentan el cierre de minas efectivo y de bajo costo, pero sobre todo Restaurando los suelos disturbados por la actividad minera, minimizando su impacto sobre los recursos hídricos, el ambiente y la salud de los pobladores vecinos.



Referencias Bibliográficas

Argota, G., Encina, M., Argota, H., & Iannacone O., J. (2014). Coeficientes biológicos de fitorremediación de suelos expuestos a plomo y cadmio utilizando *Alopecurus magellanicus* var. *bracteatus* y *Muhlenbergia angustata* (Poaceae), Puno, Perú. *The Biologist*, 12(1), 99–108. Retrieved from http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/biologist/v12_n1/pdf/a10v12n1.pdf

Ávila Minga, J. D., & Quito Arias, D. N. (2019). Identificación de la biodiversidad fúngica a través del análisis metagenómico del suelo en el área de la concesión minera Loma Larga Azuay-Ecuador (Bachelor's thesis).

Baby, S., Johnson, A. J., & Govindan, B. (2015). Secondary metabolites from *Ganoderma*. *Phytochemistry*, 114, 66–101. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2015.03.010>

Boh, B., Berovic, M., Zhang, J., & Zhi-Bin, L. (2007). *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. *Biotechnology Annual Review* (Vol. 13). [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(07\)13010-6](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(07)13010-6)

Bolger, AM., Lohse, M., Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 1;30(15):2114-20. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170. Epub 2014 Apr 1. PMID: 24695404; PMCID: PMC4103590.

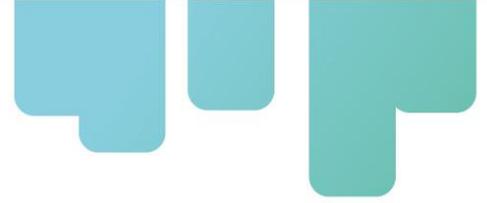
Brown, D. W., & Proctor, R. H. (2013). *Fusarium*. *Genomics, Molecular and Cellular Biology*.

Brown, J., Pirrung, M., McCue, LA. (2017) FQC Dashboard: integrates FastQC results into a web-based, interactive, and extensible FASTQ quality control tool. *Bioinformatics*. 1;33(19):3137-3139. doi: 10.1093/bioinformatics/btx373. Epub 2017 Jun 9. PMID: 28605449; PMCID: PMC5870778.

Callahan B. J., McMurdie P. J., Rosen M. J., Han A. W., Johnson A. J. A., Holmes S. P. (2016). DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13 581–583. 10.1038/nmeth.3869

Cárdenas, M., & Reina, M. (2008). *La minería en Colombia: impacto socioeconómico y fiscal*.

Cardinale, M., Ratering, S., Sadeghi, A., Pokhrel, S., Honermeier, B., & Schnell, S. (2020). The Response of the Soil Microbiota to Long-Term Mineral and Organic Nitrogen Fertilization is Stronger in the Bulk Soil than in the Rhizosphere. *Genes*, 11(4), 456. <https://doi.org/10.3390/genes11040456>



Craig, J.W., F.Y. Chang y S.F. Brady (2009). Natural products from environmental DNA hosted in *Ralstonia metallidurans*. *ACS Chemical Biology* 4: 23-28.

Druzhinina I. S., Seidl-Seiboth V., Herrera-Estrella A., Horwitz B. A., Kenerley C. M., Monte E., Mukherjee P. K., Zeilinger S., Grigoriev I. V., Kubicek C. P. (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nat Rev Microbiol* 9, 749–759. [10.1038/nrmicro2637](https://doi.org/10.1038/nrmicro2637)

Gastauer, M., Silva, J. R., Junior, C. F. C., Ramos, S. J., Souza Filho, P. W. M., Neto, A. E. F., & Siqueira, J. O. (2018). Mine land rehabilitation: Modern ecological approaches for more sustainable mining. *Journal of Cleaner Production*, 172, 1409-1422.

Gonza, I., Collado, J., Genilloud, O., Pela, F., Diez, M. T., Platas, G., & Moro, R. (1998). Production of antibacterial activities by members of the family Pseudonocardiaceae : influence of nutrients, 14, 521–527.

Gonzalez Salgado, A. (2010). Diagnóstico y Control de Especies de *Aspergillus* Productoras de Ocratoxina A. Universidad Complutense de Madrid.

Jaramillo, D. (2002). Introducción a la ciencia de suelo. Universidad Nacional De Colombia, Medellín, Colombia.

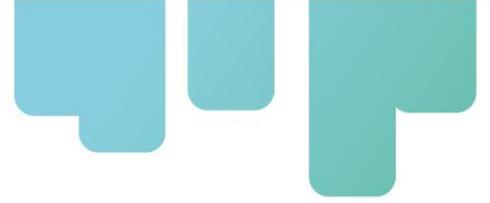
Huang, J. W., Hu, S. L., Cheng, X. K., Chen, D., Kong, X. K., & Jiang, J. D. (2019). *Steroidobacter soli* sp. Nov., isolated from farmland soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(11), 3443–3447. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003639>

Kanso, S., & Patel, B. K. C. (2003). *Microvirga subterranea* gen. nov., sp. nov., a moderate thermophile from a deep subsurface Australian thermal aquifer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(2), 401–406. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.02348-0>

Krijghsheld, P., Bleichrodt, R., van Veluw, G. J., Wang, F., Müller, W. H., Dijksterhuis, J., & Wösten, H. A. B. (2013). Development in *aspergillus*. *Studies in Mycology*, 74, 1–29. <https://doi.org/10.3114/sim0006>

Martínez Ortiz, A., & Aguilar Londoño, T. (2013). Estudio sobre los impactos socioeconómicos del sector minero en Colombia: encadenamientos sectoriales. *Nueva Serie-Cuadernos de Fedesarrollo*, 47.

Martínez, A. (2012). Impacto socioeconómico de la minería en Colombia.



Mata Fernández, I., Rodríguez Gamiño, M., López Blanco, J., & Vela Correa, G. (2014). Dinámica de la salinidad en los suelos. *Revista Digital Del Departamento El Hombre y Su Ambiente*, 1(5), 26–35. Retrieved from http://cbs1.xoc.uam.mx/e_bios/docs/2014/05_SALINIDAD_EN_SUELOS_ESPANOL.pdf

Nogales, B. (2005). La microbiología del suelo en la era de la biología molecular: descubriendo la punta del iceberg, *Ecosistemas*, vol. 14, no. 2, pp. 41–51.

Nogi, Y., Yoshizumi, M., Hamana, K., Miyazaki, M., & Horikoshi, K. (2014). *Povalibacter uvarum* gen. nov., sp. nov., a polyvinyl-alcohol-degrading bacterium isolated from grapes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(PART 8), 2712–2717. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.062620-0>

Park, D., Kim, H., Yoon, S. (2017) Nitrous Oxide Reduction by an Obligate Aerobic Bacterium, *Gemmatimonas aurantiaca* Strain T-27. *Appl Environ Microbiol.* 31;83(12):e00502-17. doi: 10.1128/AEM.00502-17. PMID: 28389533; PMCID: PMC5452805.

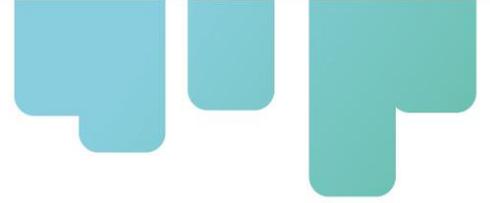
Peña-Mendoza, E. R., Gómez- Guerrero, A., Fenn, M. E., Hernández de la Rosa, P., & Alvarado Rosales, D. (2017). Nutrientes en follaje y depósito húmedo de nitrato, amonio y sulfato del lavado de copa en bosques de *Abies religiosa*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, (14), 2793. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i14.447>

Pérez-pantoja, D., Donoso, R., Agulló, L., Córdova, M., Seeger, M., Pieper, D. H., & González, B. (2012). Minireview Genomic analysis of the potential for aromatic compounds biodegradation in Burkholderiales, 14, 1091–1117. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02613.x>

Pérez, L. (2018). Análisis del aporte de residuos mineros a suelos mediante estudio de caso en punta del cobre y consideraciones para la normativa vigente, p 117.

Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., et al. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41 D590–D596. 10.1093/nar/gks1219

Reddy, G. S. N., Potrafka, R. M., & Garcia-Pichel, F. (2007). *Modestobacter versicolor* sp. nov., an actinobacterium from biological soil crusts that produces melanins under oligotrophy, with emended descriptions of the genus *Modestobacter* and *Modestobacter multiseptatus* Mevs et al. 2000. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(9), 2014–2020. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64932-0>



Ruiz, Fabián Emilio, Vargas, Xiomara, Sánchez, Ángela. (2018). Control del proceso erosivo en el botadero norte de la mina Caypa. Especialización en gerencia de proyectos. Universidad Piloto De Colombia, 228 paginas.

Ruiz, G. D., & Rodarte, C. W. (2003). Methods for the study of microbial communities in fermented foods. *Revista latinoamericana de microbiología*, 45(1-2), 30-40.

Schmoll, M., & Schuster, A. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(3), 787–799. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2632-1>

Simon, C., & Daniel, R. (2011). Metagenomic analyses: past and future trends. *Applied and environmental microbiology*, 77(4), 1153.

Tapia, C., & Amaro, J. (2014). Género *fusarium*. *Revista Chilena de Infectología*, 31(1), 85–86. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182014000100012>

Tiwary, R. K. (2001). Environmental impact of coal mining on water regime and its management. *Water, Air, and Soil Pollution*, 132(1), 185-199.

Torsvik V., Øvreås L. (2002). Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems,” *Curr. Opin. Microbiol.*, vol. 5, no. 3, pp. 240–5.

Walter, P., Pócsi István, Győri Zoltán, Pusztahelyi Tünde. (2020). The Aspergilli and Their Mycotoxins: Metabolic Interactions With Plants and the Soil Biota. *Frontiers in Microbiology*. Vol 10. Pag 2921. DOI=10.3389/fmicb.2019.02921

Watve, M. G., Tickoo, R., Jog, M. M., & Bhole, B. D. (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Archives of Microbiology*, 176(5), 386–390. <https://doi.org/10.1007/s002030100345>

Whitman, W. B. (2015). *Solirubrobacter*. *Bergey’s Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–5. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00227>

Wong, K. Y., Tan, L. and Saddler, J. N. (1988). Multiplicity of β -1-4 Xylanase in Microorganism. *Functions and Applications*. *Microbiol. Rev.*, 52: 305–317.

Wu, Z., Lei, S., Lu, Q., & Bian, Z. (2019). Impacts of large-scale open-pit coal base on the landscape ecological health of semi-arid grasslands. *Remote Sensing*, 11(15), 1820.

Xinqi Huang, Liangliang Liu, Jun Zhao, Jinbo Zhang, Zucong Cai. (2019) The families Ruminococcaceae, Lachnospiraceae, and Clostridiaceae are the dominant bacterial groups during



reductive soil disinfestation with incorporated plant residues, *Applied Soil Ecology*, Volume 135, Pages 65-72, ISSN 0929-1393, <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.11.011>.

Younger, P. L. (2004). Environmental impacts of coal mining and associated wastes: a geochemical perspective. Geological Society, London, Special Publications, 236(1), 169-209.



Instituciones participantes



Secretaría Técnica Administrativa



Con el apoyo de:



www.fontagro.org

Correo electrónico: fontagro@fontagro.org