



Universidad Nacional
Federico Villarreal

Vicerrectorado de
INVESTIGACIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

“AISLAMIENTO DE CONSORCIOS ACIDÓFILOS NATIVOS OXIDANTES DE
HIERRO MESÓFILOS DE POTENCIAL USO EN PROCESOS BIOMINEROS”

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología

AUTOR:

Bach. Salcedo Mejía, Luis Alberto

ASESOR(A)

Mg. Yupanqui Siccha, Gisela F.

JURADOS

Mg. Salas Asencios, Ramsés

Mg. Robles Román, Margarita

Dr. Iannacone Oliver, José A.

LIMA – PERÚ

2019

DEDICATORIA

A mi pedacito de cielo 'Ethan Alberto', por ayudarme a aprender cada día sobre la vida. Los días son singulares junto a ti.

A mi media naranja 'María', por ser mi soporte y alentarme cada día a seguir adelante. Te amo.

A mi hermano Miguel Eduardo, un gran luchador, me enseñas cada día con los retos y con cada conversación que tenemos aprendo mucho desde otro punto de vista.

A toda mi familia, a mis padres Rosa y Andrés por el enorme apoyo incondicional durante el desarrollo de este trabajo y también duramente mi crecimiento personal y profesional.

Luis Alberto Salcedo Mejía

AGRADECIMIENTOS

- A mi asesora Dra. Gisela Yupanqui Siccha, quien me brindó oportunidades de estudio y, a la vez, me brindó valiosos consejos para culminar este trabajo.
- A mi profesor, Dr. Mario Esparza, quien fue el causante de involucrarme en esta maravillosa área de Biominería, una valiosa disciplina que necesita el país.
- A mi profesor, Dr. Ramsés Salas, quien me brindó invaluable consejos para la culminación de este trabajo.
- Agradezco a mis profesores de mi alma mater, quienes me enseñaron muy buenos conocimientos y, a la vez, me ayudaron a ser una mejor persona.

Luis Alberto Salcedo Mejía

INDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT.....	7
I.INTRODUCCIÓN.....	8
1.1. Antecedentes... ..	10
1.2. Objetivos... ..	11
1.3. Justificación.....	11
II. MARCO TEÓRICO	12
2.1. Sistemas de biolixiviación en el mundo... ..	12
2.2. Mecanismos de biolixiviación.....	15
2.3. Ecofisiología y diversidad microbiana en ambientes mineros... ..	17
2.3.1. Geología microbiana	17
2.3.2. Fisiología y diversidad microbiana	18
2.3.2.1. Bacterias oxidantes de hierro.....	21
2.3.2.2. Ejemplos de estudios de diversidad microbiana.....	25
2.3.3. Microorganismos acidófilos involucrados en Biomineria... ..	27
2.3.3.1. Bacterias mesófilas y moderadamente termófilas... ..	27
2.3.4. Microbiología de microbios oxidantes de hierro.....	31
2.3.5. Biooxidación de hierro ferroso... ..	33
2.3.6. Extracción de ADN a través de membrana de silica gel... ..	36
2.3.7. Amplificación de PCr en punto final.....	37
2.3.7.1. Analisis de Producto de PCR.....	38
2.3.8. Analisis bioinformatico.....	39
III. MATERIALES Y MÉTODOS... ..	41
3.1. Diseño de investigación... ..	41
3.2. Ambiente temporal y espacial... ..	41
3.3. Variables de estudio... ..	43
3.4. Población y muestra de estudio... ..	43
3.5. Instrumentos.....	43
3.5.1. Equipos.....	43

3.5.2. Reactivos...	44
3.5.3. Materiales...	45
3.6. Procedimientos...	45
3.6.1. Colecta de muestra y caracterización de la muestra.....	45
3.6.2. Aislamiento de consorcios microbianos acidófilos mesófilo...	48
3.6.2.1. Cultivo de enriquecimiento inicial...	48
3.6.2.2. Purificación e incremento de biomasa.....	49
3.6.3. Pruebas de biooxidación de hierro...	50
3.6.4. Detección molecular de consorcio microbianos acidófilo...	51
3.6.4.1. Extracción de ADN	51
3.6.4.2. Amplificación de marcadores específicos por PCR	52
3.6.4.3. Identificación molecular	53
3.7. Análisis de datos...	54
IV. RESULTADOS...	55
4.1. Cultivo de consorcios microbianos acidófilos	55
4.1.1. Selección de microorganismos acidófilos hierro oxidantes...	55
4.2. Evaluación de cinética de crecimiento y biooxidación de hierro.....	57
4.3. Detección molecular de bacterias acidófilas en los consorcios microbianos y secuenciamiento de ADN.....	58
V. DISCUSIÓN...	63
VI. CONCLUSIONES	66
VII. RECOMENDACIONES	66
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
IX. ANEXOS.....	76

RESUMEN

Perú es un país eminentemente minero, estamos colocados entre los principales países de producción de metales valiosos como cobre, oro y plata. Así mismo, las reservas minerales de alta ley están disminuyendo por lo que necesitamos con urgencia nuevas tecnologías que se adopten a nuestras realidades de bajo impacto ambiental como es la biotecnología minera.

Este estudio tiene como objetivo aislar e identificar consorcios microbianos acidófilos oxidantes de hierro de potencial aplicación en biotecnología minera. Los aislados fueron realizados a partir de muestras de rocas minerales.

Se colectaron muestras de diferentes unidades mineras, como: Minera Expansa para mineral aurífero, Minera Pan American Silver para muestra polimetálico de Plata y Unidad Minera de Acarí para la muestra de Cobre.

En todas las muestras se aisló la especie *Acidithiobacillus ferrooxidans* LSM1 y sólo en la muestra aurífera se encontró la especie *Leptospirillum ferrooxidans*. Estos resultados fueron obtenidos a partir de cultivo en medio líquido, medio sólido, análisis por PCR y posterior secuenciamiento de ADN de los productos de PCR. La presencia de *Leptospirillum ferrooxidans* sólo fue confirmada a través de PCR y secuenciamiento de ADN con primers específicos para especie.

Las cinéticas de crecimiento microbiana evaluadas para los 3 aislados no mostraron diferencias significativas de acuerdo al análisis de varianza.

Las pruebas de biooxidación de hierro ferroso, resultaron mejor para el consorcio aislado a partir de la muestra de oro, que contiene *A. ferrooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans* porque oxidaron 6.5 g/L de hierro en 60 horas.

Este estudio representa un primer indicio de la recuperación de cepas de acidófilos hierro oxidantes a partir de muestras de rocas minerales.

Palabras claves: Biomineria, Acidithiobacillus, Leptospirillum

ABSTRACT

Peru is an mining country, It is placed among the main countries of production of valuable metals such as copper, gold and silver. Likewise, high-grade mineral reserves are decreasing so actually need new technologies of low environmental impact for our national realities as mining biotechnology.

The objective of this study was to isolate and identify iron-oxidizing microbial acidophilic consortia for potential application in mining biotechnology. The isolates were made from mineral rock samples.

Samples were collected from different mining units, such as: Expausa Mine for gold ore, Pan American Silver mine for silver polymetallic sample and Acarí mining unit for copper sample.

Acidithiobacillus ferrooxidans was isolated in all samples and only *Leptospirillum ferrooxidans* LSM2 was found in the gold sample. These results were obtained from culture in liquid medium, solid medium, PCR analysis and DNA sequencing of the PCR products. The presence of *Leptospirillum ferrooxidans* was only confirmed through PCR and DNA sequencing with species-specific primers.

The kinetics of microbial growth evaluated for the 3 isolates did not show significant differences according to the analysis of variance.

Ferrous iron biooxidation tests were better for the consortium isolated from the gold sample, which contains *A. ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans* because they oxidized 6.5 g / L of iron in 60 hours.

This study represents a one of the first report of the recovery of iron-oxidizing acidophilic strains from mineral rock samples in Perú.

Keywords: Biomining, *Acidithiobacillus*, *Leptospirillum*

I. INTRODUCCIÓN

La minería juega un rol importante en la economía peruana a través de la generación de valor agregado, divisas, impuestos, inversión y empleo (Macroconsult, 2012); además es el principal sector exportador del país con 62% de las exportaciones totales (MINEM, 2014). Esto debido a que el Perú ocupa lugares importantes en Latinoamérica y el mundo por su producción y potencial minero en metales valiosos como: cobre, oro, plata, plomo, entre otros (Dammert & Molinelli, 2007; MINEM, 2012). Sin embargo, la minería peruana aún tiene muchos procesos por mejorar.

La metalurgia extractiva utilizada en nuestro país, está enfocada en la producción de minerales de alta ley, establece niveles de corte (denominados “cut-off”) para rentabilizar el proceso de producción (SNMPE, 2011). Los minerales que estén por debajo del nivel de corte, se denominan minerales de baja ley, son eliminados y colocados en botaderos (Elías, 2012).

Los botaderos, clasificados como pasivos mineros causan un gran daño medioambiental (Mapaure *et al*, 2011). Éstos al interactuar con el agua en las lluvias forman drenajes ácidos o aguas ácidas por la liberación de metales y/o minerales en solución (Habashi, 2011; Dold, 2014), contaminando diversos hábitats naturales (Dabrowski *et al*, 2014).

La biolixiviación es una gran alternativa para poder explotar reservas minerales no rentables como botaderos y disminuir la generación de drenajes ácidos (Gentina & Acevedo, 2013), se fundamenta principalmente en la aplicación de microbios acidófilos con capacidades metabólicas para oxidar hierro y compuestos reducidos de azufre (Rawlings & Johnson, 2007; Chen *et al*, 2014). A través de estos principales procesos bioquímicos de oxidación de hierro y azufre, las bacterias son los principales actores durante la liberación de oro y cobre.

El cese de estos proyectos a nivel industrial y científico ha disminuido el desarrollo de la lixiviación bacteriana en el Perú.

Por otro lado, mundialmente es aceptado el uso de consorcios microbianos en la biolixiviación, conformados entre 2 a 5 especies bacterianas (Rawlings & Johnson, 2007). La diversidad microbiana es muy amplia, microorganismos que comparten nichos ecológicos a su vez comparten información genética fundamental para la

adaptación al microambiente (metales pesados) (Rawlings, 2007). La eficacia de los consorcios microbianos en el bioproceso depende de la especie mineral a procesar (Romo *et al*, 2013) y del repertorio genético que las especies bacterianas poseen (Rawlings, 2007; Brune & Bayer, 2012).

Nuestro país fue pionero en implementar esta tecnología en Sudamérica, para pre-tratamiento de oro por la empresa Minera Lisandro Proaño S.A. “Tamboraque” (1998-2003) (Ly & Van Niekerik, 2006; Brierley, 2008), y para el procesamiento de cobre por las empresas: Cerro Verde SAC (1997 – 2008) (Brierley, 2008) y Southern Copper Corporation SAC (Watling, 2006; Laznicka, 2010).

Por lo expuesto anteriormente, la hipótesis de este trabajo es plantear el aislamiento consorcios microbianos con potencial biolixiviante a partir de muestras minerales. Las muestras provinieron de diferentes zonas mineras. La selección de los consorcios específicos se realizó a través de medios de cultivo selectivos. El carácter evaluado para determinar que es un potencial consorcio biolixiviante fue la biooxidación de hierro ferroso y se determinó las especies más importantes con el uso de técnicas moleculares de PCR y Secuenciamiento de ADN.

Tabla 1. Posición del Perú en el Ranking Mundial y Latinoamericano de Producción Minera

PRODUCTO	LATINOAMERICA	MUNDO
Cobre / Copper	2	2
Plata / Silver	2	2
Zinc / Zinc	1	2
Oro / Gold	1	6
Plomo / Lead	1	4
Cadmio / Cadmium	2	8
Estaño / Tin	3	6

Fuente: Anuario Minero, MINEM (2016)

1.1. Antecedentes

A nivel internacional, hay numerosos trabajos sobre Biominería. El primer trabajo pionero (actualmente alrededor de 10000 citas), fue reportado por Temple & Colmer (1951), en el que se determina que un organismo denominado *Thiobacillus ferrooxidans* (llamado *Acidithiobacillus ferrooxidans* a partir del 2000 por Kelly & Wood, 2000), era el responsable de la producción del drenaje ácido de las minas de carbón (Gentina & Acevedo, 2013).

A partir de este importante hallazgo, se abrió una línea al potencial biotecnológico de esta bacteria comenzando con trabajos enfocados en la elaboración de métodos microbiológicos para su aislamiento y mantenimiento (Silverman & Lundgren, 1959; Tuovinen *et al*, 1973; Johnson *et al*, 1987; Schrader & Holmes, 1988; Johnson, 1995; Liu *et al*, 2007), para su caracterización y potencial biolixiviante (Zhou *et al*, 2008; Vera *et al*, 2009; Ding *et al*, 2011; Jahani *et al*, 2015) concluyendo que la mayoría de especies son sensibles a factores utilizados en el medio de cultivo, como agar o agarosa, pH, temperatura, afectando la reproducibilidad en laboratorio.

En Perú, existen muy pocos trabajos científicos realizados en este tema, se ha documentado muy poco sobre la diversidad bacteriana con potencial biolixiviante en revistas indizadas.

Trabajos peruanos pioneros, son los realizados por la Dra. Jasmin Hurtado Custodio, profesora principal de la Facultad de Ciencias de la Universidad Peruana Cayetano Heredia tiene más de 25 años de experiencia en el campo de la biominería. Otros trabajos pioneros, son los realizados en el Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, éstos en su mayoría describen la diversidad bacteriana autótrofa y/o heterótrofa en: procesos biolixiviantes (Maturrano, 1996; Gutiérrez, 1998), en drenajes ácidos de mina (Alegre, 2003; Abanto, 2008) o a nivel molecular, caracterizando moléculas de vital importancia para *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Jaramillo, 2008). En la Universidad Nacional Jorge Basadre Grosmont - Tacna, reportaron cepas de *Acidithiobacillus ferrooxidans* y un hongo (*Paecylomyces spp.*) con potencial biotecnológico para lixiviación bacteriana de Zinc (Saavedra,

2009) en columnas de percolación, aunque no se encuentra anexada a una revista científica.

Por último, en la Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas de la Universidad Nacional Federico Villarreal, hasta la fecha no se han reportado trabajos sobre biotecnología minera como trabajos de tesis, por lo cual este trabajo sería el primero en este tema.

1.2. Objetivos

▪ **Objetivo general:**

- Aislar consorcios acidófilos nativos oxidantes de hierro mesófilos a partir de muestras minerales.

▪ **Objetivos específicos:**

- Aislar microorganismos acidófilos.
- Pruebas de biooxidación de hierro.
- Identificación molecular de consorcios microbianos que logren biooxidar hierro.

1.3. Justificación

Este trabajo es un primer paso para una implementación industrial en la recuperación de oro a partir de mineral refractario.

Como lo dice Brierley (2008), en los próximos 10 años la biolixiviación/ biooxidación a nivel mundial se potenciará debido al aumento de reservas de minerales refractarios complejos difíciles de tratar para la industria minera actual. Con este trabajo se busca desarrollar esta biotecnología en el Perú debido a que la biolixiviación, consume menos reactivos (SO_4^{2-} y Fe^{2+}) que la lixiviación química y permite el procesamiento de pasivos mineros y de otros minerales a un costo menor que los métodos convencionales (Mishra et al, 2005); siendo una tecnología eco-amigable que el país necesita.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Sistemas de biolixiviación en el mundo

La biolixiviación es parte de la biotecnología minera enfocada – anteriormente - a la recuperación de metales valiosos a partir de menas de baja ley o de minerales refractarios (Rawlings & Johnson, 2007; Schippers *et al*, 2013). Actualmente se plantea la utilización de esta biotecnología para el tratamiento y recuperación de metales valiosos a partir de minerales de alta ley entre los que destacan: Plomo, Plata, Oro, Cobre, Zinc, Cadmio, Uranio (García O *et al*, 1995; Kim *et al*, 2005; Risikat *et al*, 2012; Nwoye *et al*, 2013; Tanaka *et al*, 2015).

En minería, se utiliza al hierro férrico como agente lixivante para solubilizar metales valiosos a partir de sulfuros metálicos, la biotecnología colabora en la renovación de la producción de hierro férrico a partir de hierro ferroso por procesos bioquímicos a nivel microbiano.

En Biominería se utilizan dos vocablos técnicos, Biolixiviación que significa solubilización de un metal valioso a partir de mineral (Bosecker, 1997) a través de la formación de enlaces iónicos-covalentes y Biooxidación que significa la liberación parcial de un metal no soluble a través de un pre-tratamiento (Lynn, 1997), muy utilizado en la hidrometalurgia del oro. Para fines de este documento el vocablo biolixiviación englobará ambos términos. Principalmente existen dos tipos de procesos de biolixiviación:

Primero, Biolixiviación en pilas (Figura 1), es un proceso de lixiviación basado en irrigación, caracterizado por baja inversión, poco equipamiento, bajo costo de operación, y rendimiento razonable sobre un período de recirculación, adecuados para menas de baja ley. Generalmente se utiliza para recuperar metales valiosos a partir de sulfuros metálicos como (Cobre, Cadmio, Zinc, Plomo). Los factores críticos son: condiciones de humedad, pH, temperatura, fuentes de energía y nutrientes. Una limitación importante es la dificultad para suministrar aire eficientemente y la formación indeseable de gradientes de pH.

El proceso comienza con la transformación de un sulfuro metálico (insoluble) a sulfato metálico (soluble) y posterior recuperación del metal a través de un proceso denominado electrowining. (Rawlings & Johnson, 2007; Pradhan *et al.*, 2008)

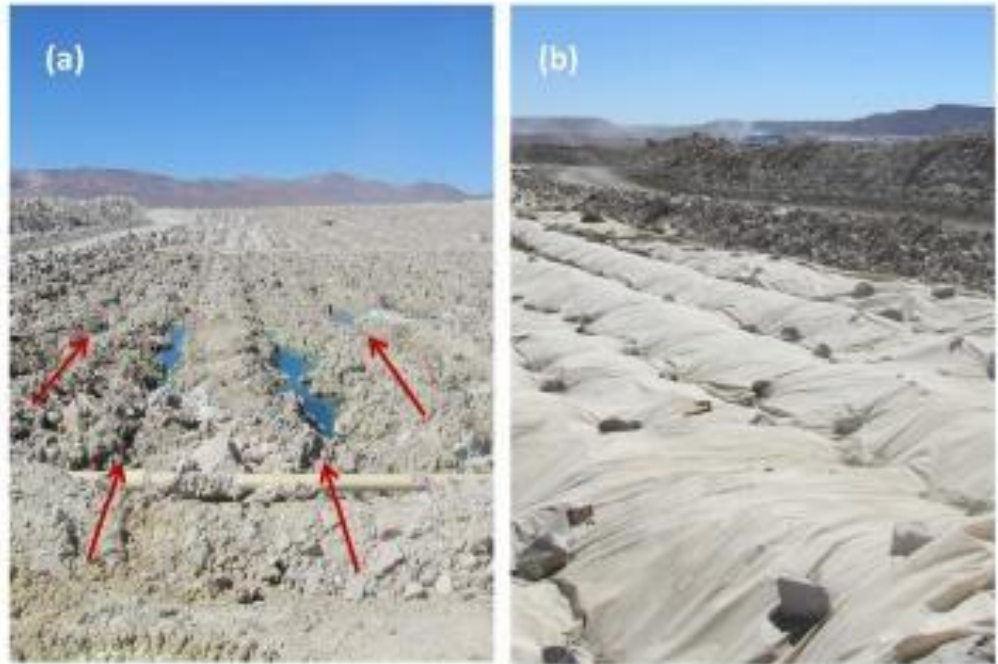


Figura 1. Pila de Biolixiviación de la Mina Escondida (BHP Billinton), Antofagasta – Chile, es el más grande biorreactor en el mundo, con un área de superficie de 10^7 m². (a) superficie con líneas de irrigación y (b) cobertura para retener el calor y la humedad. Figura adaptada de *Shiers et al.*, 2016.

Segundo, Biolixiviación en tanques agitados (Figura 2), es una tecnología desarrollada por la necesidad de complejas reacciones bioquímicas. El uso de reactores puede permitir un buen control de parámetros (pH, Temperatura, disponibilidad de O₂, etc), por ejemplo, parámetros de productividad volumétrica y grado de extracción pueden ser incrementados significativamente. Generalmente, su aplicación está basada para el pre-tratamiento de oro refractario (Acevedo, 2000; Rawlings & Johnson, 2007).

Olson y cols (2003) y Brierley & Brierley (2013) describieron el desarrollo histórico de las aplicaciones de procesos de Biolixiviación en industrias mineras. En estos últimos diez años, el progreso ha sido significativo para comprender y optimizar la biolixiviación de cobre a partir de sulfuros minerales primarios de cobre, como calcopirita, covelita y enargita con cerca de 18 plantas activas actualmente y los procesos de pre-tratamiento de oro por biooxidación están en incremento a nivel mundial para potenciar la recuperación de este metal precioso con 13 plantas activas a nivel mundial (ver Figura 2).



Figura 2. Proceso BIOX® para biooxidación de oro refractario concentrado en la mina Fairview Gold, Sudafrica. Figura adaptada de *Kaksonen et al, 2014*.

La mayoría de las plantas para la biolixiviación de cobre se encuentran en Sudamérica, debido a que los depósitos de minerales de cobre secundarios son abundantes. El éxito de la biolixiviación de estos depósitos es considerado de aplicación exitosa cuando la recuperación es por encima de 80%.

La principal tecnología utilizado en el pre-tratamiento del oro refractario es BIOX ® marca registrada por GENCOR Inc., implementada por primera vez en Fairview Mine (GoldFields – 1986) en Sudáfrica. Esta tecnología

opera a una temperatura promedio de 45°C utilizando microorganismos como: *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans* y *L. ferrooxidans*.

Ambos procesos utilizan microorganismos oxidantes de hierro y oxidantes de compuestos reducidos de azufre como principales actores del proceso de biolixiviación.

En el Perú muy poco se ha documentado acerca de procesos biomineros industriales, el caso de estudio más conocido es el de Tamboraque. Ly y Van Niekerik (2006), describe el proceso BIOX® utilizado en Tamboraque, Perú. Esto involucraba la optimización del proceso, para aumentar el consumo de 200 toneladas a 600 toneladas de oro refractario por día. Previamente, se caracterizó un consorcio microbiano nativo que habita las aguas ácidas nacies de la bocamina de esta planta y se hicieron pruebas piloto de 50Kg por día durante 20 meses. La eficiencia de este proceso en Tamboraque es de 85% (Figura 3).



Figura 3. Planta BIOX® de procesamiento de oro refractario en Tamboraque (Perú). Figura adaptada de *Rawlings et al*, 2003.

2.2. Mecanismos de biolixiviación.

Según Vera y cols (2013), en el pasado se describía dos mecanismos “directo” e “indirecto”. Mecanismo directo, es una transferencia directa de electrones del sulfuro metálico a la célula microbiana adherida a la superficie mineral. Mecanismo indirecto es realizado por un agente oxidante de sulfuro metálico, como iones de hierro III (Fe^{3+}) que es generado por bacterias oxidantes de hierro libres o adheridas al mineral.

Según el mismo autor, la teoría del mecanismo directo no puede ser demostrada porque aún no se ha demostrado la adhesión de las bacterias al sulfuro metálico.

Las bacterias adheridas brindan una reacción óptima para la lixiviación indirecta a través de iones hierro férrico por medio de exo-polisacáridos (EPS). Para entender mejor estos procesos, los términos “lixiviación por contacto” y “lixiviación sin contacto” han sido propuestos para biolixiviación por células adheridas y plantónicas, respectivamente.

Se describen distintos tipos de vías de ataque al mineral, principalmente se conocen dos tipos de vías (Figura 4).

A. Via tiosulfato, descrito para sulfuros metálicos insolubles en ácido como pirita, molibdenita y tungstenita (FeS_2 , MoS_2 , WS_2) son oxidados vía un agente oxidante como iones de hierro III (Fe(III)).

En estos sulfuros metálicos, los enlaces químicos entre el azufre y el metal no se rompen hasta después de seis etapas sucesivas de oxidación, liberando sulfato. El producto intermediario dentro de la reacción es el tiosulfato (Mishra *et al*, 2005; Vera *et al*, 2013; Tao & Dongwei, 2014; Kundu & Kumar, 2014).

B. Via polisulfuro, está descrito para sulfuros metálicos solubles en ácido como esfalerita (ZnS), galena (PbS), arsenopirita (FeAsS) y calcopirita (CuFeS_2). Estos sulfuros son disueltos por el efecto combinado de iones de hierro (III) y protones. Los enlaces químicos entre el metal y el azufre son cortados, liberando sulfuro de hidrógeno. (Mishra *et al*, 2005; Vera *et al*, 2013; Tao & Dongwei, 2014; Kundu & Kumar, 2014)

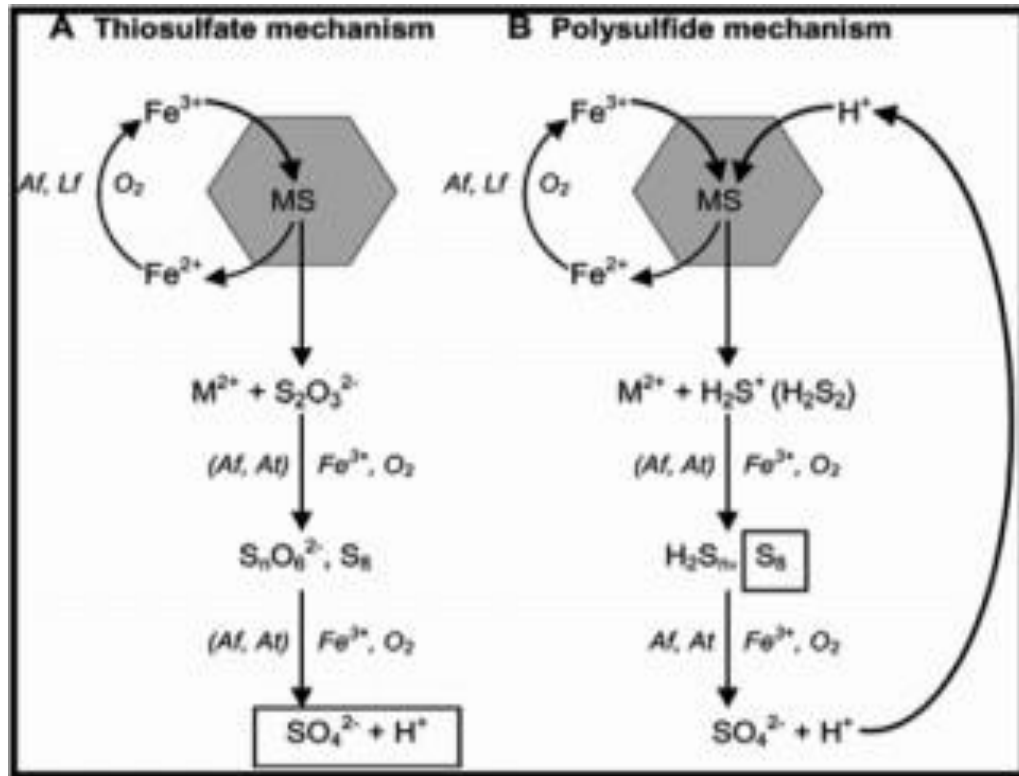


Figura 4. Representación esquemática de los mecanismos tiosulfato (A) y polisulfuro (B). Figura adaptada de *Sand et al*, 2003

2.3. Eco fisiología y diversidad microbiana en ambientes mineros

2.3.1. Geología microbiana

Microorganismos capaces de desarrollarse en condiciones extremas, denominados extremófilos, están siendo recientemente atractivos por su fisiología y ecología. Los ambientes ácidos son muy interesantes porque, en general, el bajo pH del hábitat es consecuencia propia del metabolismo microbiano y no de una condición externa impuesta como (temperatura, acidez, radiación, entre otros) (González-Toril *et al*, 2003a).

Una zona extremo-acidófila muy estudiada durante mucho tiempo es el Río Tinto en España, el cual posee más de 100 Km de largo en el sureste de España, desemboca en el núcleo del cinturón ibérico pirítico,

su nombre es debido a una importante región minera que opera por más de 5,000 años. El cinturón pirítico ibérico posee cuerpos grandes de sulfuros de hierro y cobre. La cuenca del río Tinto cubre cerca de 1,700 Km² y su pendiente facilita la presencia de una comunidad microbiana densa en el cauce (González-Toril *et al*, 2003b; Sánchez-Andrea *et al*, 2011).

En el planeta se encuentran muchos ambientes naturales y hechos por el hombre con diferentes grados de acidez. También existen ambientes ácidos a altas temperaturas en zonas de actividad volcánica y en áreas donde la corteza terrestre es delgada. Algunos ejemplos de estos ambientes son: Parque Nacional de Yellowstone (USA), Montserrat (Indias occidentales), Whakarewarewa (Nueva Zelanda), Krisuvik (Islandia), the Kamchatka (Rusia), Sao Michel (Azores), Volcano, Naples and Ischia (Italia) and Djibout (África) (Johnson & Schipeers, 2017) Relacionado a esto, son los sistemas hidrotermales submarinos abisal y profundos, como el del Atlántico medio, el Pacífico del este, las Guayanas. Los sistemas hidrotermales submarinos al estar influenciados por el agua de mar, tienen un rango de pH entre 5 y 8, y salinos. Existen sitios ácidos dentro de áreas volcánicas o hidrotermales, comúnmente localizados dentro de capas solfatáricas. La acidez extrema y altas temperaturas causan la destrucción parcial o completa de minerales en las cercanías de la solfatara, comenzando la formación de macetas de barro ácido. El aumento de la temperatura disminuye la solubilidad de oxígeno (Rawlings & Johnson, 2002).

2.3.2. Fisiología y Diversidad Microbiana

En estos bioprocesos, los principales actores son microorganismos con característica acidófilos.

Mucho tiempo atrás, se creía que las aguas ácidas (como drenajes ácidos de mina) no albergaban vida microbiana (Dopson *et al*, 2003), pero actualmente con el avance de la ciencia y la naciente área de

astrobiología, se descubrió que existe vida hasta en el lugar menos probable –condiciones extremas- (Pikuta & Hoover, 2007).

Los ambientes mineros (aguas acidas de mina, rocas minerales, sistemas de lixiviación y biolixiviación) albergan vida microbiana y con

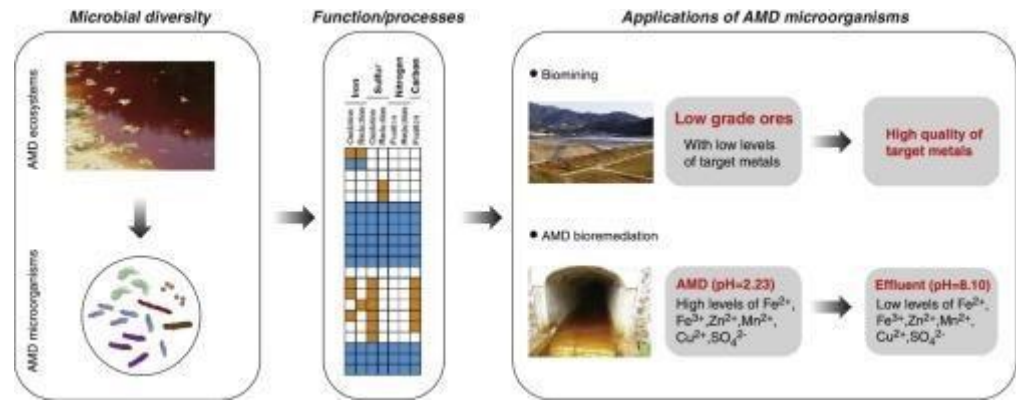


Figura 5. Aplicaciones de la diversidad y eco-fisiología microbiana en drenajes ácidos de mina para la recuperación y/o remediación de metales de valor económico. Figura adaptada de *Chen et al*, 2016.

algunas excepciones vida pluricelular (algas), los cuales se han encontrado organismos de los tres reinos (Bacteria, Arquea y Eucariota)(Johnson, 1998; Johnson, 2008; Ñancuqueo & Johnson, 2012; Brune & Bayer; 2012).

Estos microorganismos se clasifican de acuerdo a la temperatura en:

- Psicrotolerantes (Hallberg *et al*, 2010)
- Mesófilos (Niemela *et al*, 1994)
- Termófilos moderados (Wang *et al*, 2014)
- Termófilos (Ding *et al*, 2011).

De acuerdo a la concentración de iones hidrógenos (pH) en:

- Acidófilos (crecimiento óptimo <pH 3) (Johnson, 1998)
- Acidófilo-moderado (crecimiento, pH 3-5) (Hallber & Johnson, 2003)
- Acidófilo-tolerantes (crecimiento óptimo, mayor a pH5)

De acuerdo al metabolismo de carbono en:

- Autótrofo

- Heterótrofo

De acuerdo a la fuente de energía en:

- Quimiotrófo

Acidófilos tienden a tener formas de vida especializadas, y muchos son incapaces de crecer en ambientes de pH neutro. Se definen microorganismos extremo-acidófilos a aquellos que crecen óptimamente a un pH menor o igual a 3, comprenden: organismos autótrofos y heterótrofos pertenecientes a los tres dominios: *Arquea*, *Bacteria* y *Eucariota*, filogenéticamente diversos. Se excluyen de esta definición a aquellos organismos que pueden ser tolerantes, es decir, no crecen óptimamente a pH 3 o menor, aquellos son: patógenos humanos que son capaces de tolerar el pH ácido del medio ambiente estomacal. Por ejemplo, *Helicobacter pylori*, exhibe algunos atributos energéticos de los acidófilos extremos, pero no ha sido reportado su crecimiento en medio de cultivo a pH menor a 4 (Johnson, 2008; Rawlings & Johnson, 2007)

Microorganismos acidófilos que habitan ambientes naturales o artificiales, incluyendo operaciones de Biominería, interactúan entre ellos, y por lo general, el efecto neto de esta interacción es adverso para por lo menos uno de los microbios involucrados, aunque existen casos en los que uno o ambos se benefician a partir de esta interacción (Ijaz et al, 2017). En el bioprocesamiento comercial de minerales, podemos encontrar muchos ejemplos como es la disolución oxidativa de pirita (FeS_2) por bacterias acidófilas *Leptospirillum ferriphilum* y *Acidithiobacillus caldus*. La bacteria *L. ferriphilum* es un acidófilo oxidante de hierro que es incapaz de oxidar azufre, mientras que la bacteria *At. caldus* tiene capacidades opuestas. La pirita es un sulfuro mineral insoluble en ácido y es oxidado por hierro férrico (Fe^{3+}) producido por el microbio oxidante de hierro. Los compuestos de azufre

inorgánico reducido (RISCs) pertenecientes a la pirita son atacados por el hierro férrico, al ser liberados son oxidados a ácido sulfúrico por *At. caldus*, generando condiciones ácidas extremadamente baja en el cual *L. ferriphilum* logra una oxidación acelerada de la pirita (Xia et al, 2009). Se ha demostrado que la sinergia de producción de ácido por una bacteria oxidante de azufre o RICS y la bacteria acidófila oxidante de hierro *L. ferriphilum* contribuye en aumentar la eficiencia de cultivos mixtos (Zhang et al, 2008)

La transferencia de carbono, es otra importante vía en el cual microorganismos biomineros interactúan, la asociación es mutualista. Muchas bacterias oxidantes de hierro o azufre importantes en Biominería son autótrofos. Estos fijan dióxido de carbono y lo convierten en biomasa. Parte de este carbono se pierde por el metabolismo activo y en mayor cantidad cuando las células mueren y se lisan. En los lugares donde las poblaciones microbianas son abundantes (como es el caso de los tanques agitados), el carbono orgánico se acumula a altas concentraciones en los tanques, inhibiendo el crecimiento de las más sensibles bacterias acidófilos (principalmente *Leptospirillum spp.*). Los acidófilos que metabolizan carbono orgánico (llamados mixótrofos y/o heterótrofos) parecen ser ubicuos en sistemas biomineros (ellos pueden también contribuir a la oxidación neta de hierro y/o azufre), con lo cual tienen un rol importante en la eliminación de carbono orgánico de los licores lixiviantes y el mantenimiento robusto de comunidades microbianas biolixiviantes (Chen et al, 2014; Gumulya et al, 2018).

2.3.2.1. Bacterias oxidantes de hierro

Llamadas “bacterias del hierro” fueron uno de los primeros microorganismos observados y colectados por microbiólogos, como Ehrenberg y Winogradsky, a inicios de 1800. Antiguamente se consideraban catalizadores de la oxidación del hierro (de hierro ferroso (Fe^{2+}) a hierro férrico (Fe^{3+})), a menudo causando la precipitación del

Fe^{3+} y acumulándose como depósitos de ocre. Actualmente esta definición se está extendiendo para incluir otros microorganismos, como *Geobacter spp.*, quien cataliza el proceso opuesto a la oxidación, que es la reducción disimilatoria de hierro férrico (Fe^{3+}) a hierro ferroso (Fe^{2+}) (Emerson *et al*, 2010).

Estos microorganismos extremo-acidófilos son materia de investigación por la importancia percibida en las aplicaciones industriales y el ciclo del hierro. Principalmente las bacterias de hierro están clasificadas taxonómicamente pertenecientes a los taxones Nitrospira y Firmicutes, correspondientes al grupo Proteobacteria dentro del dominio Bacteria. Este grupo es diverso, agrupando múltiples especies diferentes en términos de su respuesta a oxígeno (aerobios obligados, anaerobios facultativos y obligados) y están mostrando crecer óptimamente en la presencia de 1-2% de cloruro de sodio (Hedrich *et al*, 2011).

Analizando las secuencias del gen 16S rRNA de *A. thiooxidans* y '*T. prosperus*' claramente están en el grupo Gammaproteobacteria, una clase en el cual *Acidithiobacillus spp.* está generalmente considerado estar afiliado. Sin embargo, Williams y cols (2010), usando datos obtenidos a partir de análisis multi-proteico, han cambiado la vista de aceptación general de que el orden *Acidithiobacillus* es afiliado a los Gammaproteobacteria, sugirió que esta bacteria y la bacteria marina neutrófila oxidante de hierro *Mariprofundus ferrooxidans*, divergieron después del establecimiento de los alfa-proteobacteria y antes de la separación Beta-proteobacteria/Gammaproteobacteria. Como los otros oxidantes de hierro descritos en esta sección, '*Ferrovum myxofaciens*' es un extremo-acidófilo, con un pH óptimo de 3.0 y un pH mínimo de 1, esto es menor que para las bacterias acidófilas *Acidithiobacillus spp.*, *Af. thiooxidans* y '*T. prosperus*'. Originalmente esta bacteria, parece oxidar sólo hierro ferroso, y con condición estrictamente aerobia. '*F. myxofaciens*' es ampliamente distribuido en sitios ácidos, ricos en

hierro. Se ha identificado como la principal bacteria oxidante de hierro colonizadora de una planta de tratamiento de agua a escala piloto para oxidar y precipitar hierro a partir de agua contaminada. Otras bacterias

Tabla 2. Lista de microorganismos acidófilos de importancia en Biominería y su rango de pH y Temperatura óptima. (Schippers, 2007; Schippers *et al*, 2013)

Especie	Óptimo pH	Mínimo-Máximo pH	Óptima Temperatura (°C)	Mínimo-Máximo Temperatura (°C)
Bacterias mesófilas y moderadamente termófilas				
<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i>	2	na	45-50	<30-55
<i>Acidithiobacillus albertensis</i>	3.5-4.0	2.0-4.5	25-30	Na
<i>Acidithiobacillus caldus</i>	2.0-2.5	1.0-3.5	45	32-52
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	2.5	1.3-4.5	30-35	10-37
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	2.0-3.0	0.5-5.5	28-30	10-37
<i>Alicyclobacillus disulfidooxidans</i>	1.5-2.5	0.5-6.0	35	4-40
<i>Alicyclobacillus tolerans</i>	2.5-2.7	1.5-5	37-42	<20-55
<i>"Caldibacillus ferrivorus"</i>	1.8	na	45	<35->55
<i>"Ferrimicrobium acidiphilum"</i>	2-2.5	1.3-4.8	37	<10-45
<i>Leptospirillum ferriphilum</i>	1.3-1.8	na	30-37	Na-45
<i>"Leptospirillum ferrodiazotrophum"</i>	na	<1.2<	na	<37<
<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	1.5-3.0	1.3-4.0	28-30	Na
<i>Sulfobacillus acidophilus</i>	2	na	45-50	<30-55
<i>"Sulfobacillus montserratensis"</i>	1.6	0.7->2	37	<30-43
<i>Sulfobacillus sibiricus</i>	2.2-2.5	1.1-3.5	55	17-60
<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i>	2	1.5-5.5	45-48	20-60
<i>Sulfobacillus thermotolerans</i>	2-2.5	1.2-5	40	20-60
<i>"Thiobacillus plumbophilus"</i>	Na	4.0-6.5	27	9-41
<i>"Thiobacillus prosperus"</i>	2	1.0-4.5	33-37	23-41
<i>Thiomonas cuprina</i>	3.5-4	1.5-7.2	30-36	20-45
Arqueas mesófilas y moderadamente termófilas				
<i>"Ferropasma acidarmanus"</i>	1.2	<0-1.5	42	23-46
<i>Ferropasma acidiphilum</i>	1.7	1.3-2.2	35	15-45
<i>"Ferropasma cupricumulans"</i>	1-1.2	0.4-1.8	54	22-63
Arqueas extremadamente termófilas				
<i>Acidianus brierleyi</i>	1.5-2.0	1-6	70	45-75
<i>Acidianus infernus</i>	2	1-5.5	90	65-96
<i>Metallosphaera hakonensis</i>	3	1-4	70	50-80
<i>Metallosphaera prunae</i>	2-3	1-4.5	75	55-80
<i>Metallosphaera sedula</i>	2-3	1-4.5	75	50-80
<i>Sulfolobus metallicus</i>	2-3	1-4.5	65	50-75
<i>Sulfolobus yangmingensis</i>	4	2-6	80	65-95
<i>Sulforococcus mirabilis</i>	2-2.6	1-5.8	70-75	50-86
<i>Sulforococcus yellowstonensis</i>	2-2.6	1-5.5	60	40-80

involucradas en la oxidación de hierro se han clasificado como ‘acidófilos moderados’ (pH óptimo para crecer de 3 a 5), se han reportado ocasionalmente para catalizar la oxidación de hierro en

Tabla 3. Microorganismos acidófilos de importancia en biominería y sus propiedades biológicas de oxidación y crecimiento. (Schippers, 2007; Schippers *et al*, 2013)

Especie	Pirita	Oxidación de Sulfuros metálicos	Oxidación de iones de Fe(II)	Azufre	Crecimiento
Bacterias mesófilas y moderadamente termófilas					
<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i>	+	na	+	-	F
<i>Acidithiobacillus albertensis</i>	-	+	-	+	A
<i>Acidithiobacillus caldus</i>	-	+	-	+	F
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	+	+	+	+	A
<i>Acidithiobacillus thiooxidans</i>	-	+	-	+	A
<i>Alicyclobacillus disulfidooxidans</i>	+	na	+	+	F
<i>Alicyclobacillus tolerans</i>	+	+	+	+	F
“ <i>Caldibacillus ferrivorus</i> ”	+	na	+	+	F
“ <i>Ferrimicrobium acidiphilum</i> ”	+	na	+	-	H
<i>Leptospirillum ferriphilum</i>	+	+	+	-	A
“ <i>Leptospirillum ferrodiazotrophum</i> ”	na	na	+	na	A
<i>Leptospirillum ferrooxidans</i>	+	+	+	-	A
<i>Sulfobacillus acidophilus</i>	+	+	+	+	F
“ <i>Sulfobacillus montserratensis</i> ”	+	na	+	+	F
<i>Sulfobacillus sibiricus</i>	+	+	+	+	F
<i>Sulfobacillus thermosulfidooxidans</i>	+	+	+	+	F
<i>Sulfobacillus thermotolerans</i>	+	+	+	+	F
“ <i>Thiobacillus plumbophilus</i> ”	-	+	-	+	A
“ <i>Thiobacillus prosperus</i> ”	+	+	+	+	A
<i>Thiomonas cuprina</i>	-	+	-	+	F
Arqueas mesófilas y moderadamente termófilas					
“ <i>Ferroplasma acidarmanus</i> ”	+	na	+	-	F
<i>Ferroplasma acidiphilum</i>	+	na	+	-	F
“ <i>Ferroplasma cupricumulans</i> ”	na	+	+	+	F
Arqueas extremadamente termófilas					
<i>Acidianus brierleyi</i>	+	+	+	+	F
<i>Acidianus infernus</i>	+	+	+	+	A
<i>Metallosphaera hakonensis</i>	na	+	na	+	F
<i>Metallosphaera prunae</i>	+	+	+	+	F
<i>Metallosphaera sedula</i>	+	+	+	+	F
<i>Sulfolobus metallicus</i>	+	+	+	+	A
<i>Sulfolobus yangmingensis</i>	+	+	na	+	F
<i>Sulforococcus mirabilis</i>	+	+	+	+	F
<i>Sulforococcus yellowstonensis</i>	+	+	+	+	F

condiciones de ausencia de oxígeno (anaerobiosis). Este grupo de bacterias está representado por bacterias *Thiomonas* spp. (mixótrofo, oxidante de azufre, beta-proteobacteria) que está siendo reportado por

precipitar hierro férrico. Sin embargo, tenemos que tener cuidado para diferenciar la oxidación de hierro biológica y abiótica en estas bacterias. Se ha reportado que cepas de *Thiomonas* lograron oxidar hierro ferroso en medio líquido y medio sólido, pero en biorreactores controlados no se produjo ese proceso, llevando a la conclusión que *Thiomonas* spp. probablemente no cataliza directamente la oxidación de hierro ferroso. Una hipótesis planteada es que cambios pequeños en el pH del cultivo de acidófilos moderados puede inducir la rápida oxidación química de hierro.

2.3.2.2. Ejemplos de estudios de diversidad microbiana

Gonzales-Toril y cols (2003) analizaron la diversidad microbiana del Rio Tinto (España). La composición de la comunidad fue estudiada por análisis DGGE (Electroforesis en gel de gradiente denaturado) usando el marcador molecular conservado gen 16S rRNA. Los organismos encontrados fueron *Leptospirillum* spp., *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Acidiphilium* spp., '*Ferrimicrobium acidiphilum*', *Ferroplasma acidiphilum*, y *Thermoplasma acidophilum*. Mayor al 80% de las células fueron relacionadas al dominio Bacteria, con solo una pequeña porción de arqueas. La detección y cuantificación se realizó con la técnica molecular FISH (Hibridación fluorescente in vitro). Cepas de las especies bacterianas *Leptospirillum ferrooxidans*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Acidiphilium* spp., fueron los más predominantes.

Ñancucho & Jonhson (2012), aislaron dos algas acidófilas, identificadas como *Chlorella protothecoides* var. *acidicola* y *Euglena mutabilis*, fueron aisladas a partir de muestras de minas de cobre en España y Wales. Crecieron óptimamente en biorreactores controlados (pH y temperatura). Los parámetros que obtuvieron para el crecimiento óptimo de *Chlorella* fueron pH 2.5 y 30°C, con un tiempo de generación de 9 horas. Los aislados de ambas algas mostraron tolerancia a metales

de transición (Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} y Zn^{2+}) en el rango de 10mM a 50mM.

Demergasso y cols (2005) analizaron y monitorearon la comunidad microbiana de bacterias y arqueas en pilas de lixiviación de cobre de baja ley en Minera Escondida (Chile), mediante la técnica de biología molecular DGGE (Electroforesis en gel de gradiente denaturado) y secuenciamiento del marcador molecular conservado gen 16S rRNA. Luego de 1 año de evaluación y monitoreo del gen 16S rRNA, revelaron que un conjunto de secuencias recuperadas se relaciona a las especies *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Leptospirillum ferriphilum*, *Ferroplasma acidiphilum*, por análisis filogenético. Algunas secuencias no tuvieron buena consistencia en el análisis, obteniendo <95% de similaridad a cultivos de microorganismos de los géneros *Sulfurisphaera* y *Sulfobacillus*, en el fragmento de 16S rRNA analizado.

Este estudio de Demergasso (2005) reveló que las bacterias habitantes en las pilas de lixiviación de Minera Escondida son principalmente de microorganismos oxidantes de hierro y azufre. Un grupo restante se relaciona con arqueas de la categoría ‘crenarqueota’ descritas en por técnicas moleculares independientes de cultivo. Se evidenció una distribución temporal en relación a las secuencias genéticas de 16S rRNA microbiano, el cual puede ser dividido en 3 periodos. El ciclo de biolixiviación, fue descrita en: primera etapa, *A. ferrooxidans* y una arquea *Sulphurisphaera* dominaron en su dominio filogenéticamente respectivo. En la segunda etapa (de 255 a 338 días), los grupos bacterianos de *Leptospirillum* y *Ferroplasma* dominaron, respectivamente. Finalmente (la tercera etapa desde 598 a 749 días), microorganismos tipo *Sulfobacillus* comenzaron a ser dominantes, mientras que *Ferroplasma* fue la única arquea detectada.

Hao y cols (2007), evaluaron una muestra de un drenaje ácido de mina (DAM) de la región de Anhui (China). La muestra colecta fue

sedimento (pH 2.5), principalmente para encontrar microorganismos anaerobios. Se analizó con técnicas de biología molecular, como son: PCR (reacción en cadena de la polimerasa) del marcador molecular conservado 16S rRNA y la técnica ARDRA (análisis por enzimas de restricción del ARN ribosomal amplificado). Obtuvieron 10 diferentes grupos bacterianos identificados y fueron relacionados con los grupos: Acidobacteria, β/γ -proteobacteria, δ -proteobacteria, Nitrospira y bacterias Gram positivas de baja cantidad G+C. El Análisis filogenético del marcador molecular 16S rRNA reveló una diversidad de nuevas bacterias acidófilas. Las secuencias genéticas de 16S rRNA afiliadas con δ -Proteobacteria constituyeron más del 60%. Este grupo tiene la característica fisiológica predominante de reducción anaeróbica de sulfatos o metales. Este microambiente anaeróbico al contener alta cantidad de sulfato, hierro y presencia de carbón biodisponible puede brindar las condiciones óptimas para el crecimiento y dominancia de este grupo microbiano δ -proteobacteria.

2.3.3. Microorganismos acidófilos involucrados en Biominería.

2.3.3.1. Bacterias mesófilas y moderadamente termófilas

Proteobacteria

Acidithiobacillus spp. El género *Acidithiobacillus* fue propuesto por Kelly & Wood (2000) después de la reclasificación de algunas especies del género *Thiobacillus*.

La afiliación del género *Acidithiobacillus* a los β - o γ -Proteobacteria no está claramente definida en la literatura. Especies del género *Acidithiobacillus* son acidófilos obligados (pH < 4.0), gram-negativos, bacilos móviles, CO₂ es fijado por el ciclo de Benson-Calvin. El género comprende las siguientes especies: *At. ferrooxidans*, *At. thiooxidans*, *At. caldus*, *At. albertensis*, *At. ferrivorans*, *At. ferridurans*.

Acidithiobacillus ferrooxidans, (cepa tipo ATCC 23270 = CIP 104768 = DSM 14882). *At. ferrooxidans* (formalmente llamado

Thiobacillus ferrooxidans) fue el primero descrito (Colmer & Hinkle, 1947) y es el organismo oxidante de sulfuros metálicos más estudiado.

At. ferrooxidans es un bacilo, usualmente sólo o pareado, 0.5 x 1.0 μm . Motil por un solo flagelo polar. Pequeñas colonias (0.5-1.0mm). Es un autótrofo obligado, estrictamente aerobio y consigue su energía a partir de la oxidación de hierro ferroso, varios compuestos de azufre (azufre elemental, tiosulfato, tetrionato, tiosulfato, sulfuro) e hidrogeno. Óptima temperatura de crecimiento: 30-35°C, rango de temperatura: 10-37°C, óptimo pH: ~2.5, rango de pH: 1.3-4.5 (Schippers, 2007) Esta siendo reportado para oxidar arsenopirita (AsFeS), bornita (Cu_5FeS_4), chalcocita (Cu_2S), calcopirita (CuFeS_2), covelita (CuS), enargita ($3\text{Cu}_2\text{S} \cdot \text{As}_2\text{S}_5$), galena (PbS), millerita (NiS), orpimenta (As_2S_3), pirita (FeS_2), marcassita (FeS_2), marcassita (FeS_2), esfalerita (ZnS), wurtzita (ZnS), stibnita (Sb_2S_3), como tambien sulfuro de galio y los sulfuros metálicos sintéticos CdS , CoS , CuS , Cu_2S , FeS , MnS , MoS_2 , NiS , PbS , SnS y ZnS .

La capacidad para oxidar iones de hierro ferroso (Fe (II)) y pirita es la característica clave de estas especies de *Acidithiobacillus*. Durante el crecimiento en compuestos de azufre, *At. ferrooxidans* esta siendo observado para acumular depósitos de azufre fino, los cuales son predominantemente asociados con la pared celular. El organismo también crece anaeróbicamente con compuestos de azufre o hidrogeno como donador de electrones y iones de hierro (Fe (III)) como aceptor de electrones. Fijación de N_2 está siendo demostrado. *At. ferrooxidans* vive en un ambiente con alto contenido de concentración de iones metálicos, este es resistente a muchos cationes metálicos, aunque los metales pueden ser oxianiones

tienden a ser altamente tóxicos. Por ejemplo, las concentraciones de metal o arsénico por las que la actividad metabólica de *At. ferrooxidans* todavía se produce son 84 mM As(III), 800 mM Cu(II), 1071 mM Zn(II), 500 mM Cd(II), y 1000 mM Ni(II). Cepas de *At. ferrooxidans* están siendo a menudo aisladas a partir de diferentes ambientes ácidos. El organismo ha sido el más abundante en ambientes de pila de lixiviación que en operaciones en columna o tanques de lixiviación (Schippers, 2007)

At. ferrooxidans es filogenéticamente heterogéneo. Las indistinguibles cepas de *At. ferrooxidans* son divididas en por lo menos 4 genovares. Las cepas acidófilas oxidantes de hierro (Fe (II)) SPIII/3 y m-1(DSM 2392) está mostrando ser no tan relacionadas al género *Acidithiobacillus* (Schippers, 2007).

Acidithiobacillus thiooxidans (cepa tipo ATCC 19377 = CIP 104597 = DS 14887 = JCM 3867 = NCIMB 8343) fue descrito por Waksman y Joffe (1992). Bacilos pequeños, emparejados o en cadenas cortas, 0.5 x 1.0-2.0 μ m. Móviles por medio de un flagelo polar. Colonias pequeñas (0.5 – 1.0 mm) creciendo en agar tiosulfato se muestran transparentes o blanquecinos-amarillos y claros en incubación prolongada. Este organismo no oxida hierro.

Quimolitótrofo obligado y autótrofo, estrictamente aerobio. Sulfato de amonio es usado como fuente de nitrógeno. Temperatura óptima de crecimiento: 28-30°C, rango de temperatura: 10-37°C. pH óptimo: 2.0-3.0, rango pH de crecimiento: 0.5-5.5. Aislado a partir de suelo, sitios de azufre, aguas ácidas de mina, ambientes de acero, entre otros. Miembro de los *Gammaproteobacteria*.

Este crece obligatoriamente autotrófica con varios compuestos de azufre, por ejemplo, azufre elemental, tiosulfato y tetracionato. Crecimiento sobre los siguientes sulfuros metálicos han sido reportados: covelita, galena, esfalerita, wurtzita. *At. thiooxidans* no oxida pirita.

Leptospirillum Las especies pertenecientes a este género están descritos como pequeños, gram-negativos, células con forma vibrioide o espiral (0.9-2.0 x 0.2-0.5 um), mótils por medio de único flagelo polar. No se conocen estados de descanso. Son quimiolitótrofos obligados, usan la oxidación de hierro ferroso (o hierro contenido en sulfuros minerales, como pirita) como única fuente de energía, y fijan dióxido de carbono (CO₂) a través del ciclo Benson-Calvin. Acidófilos y aerobios obligados: óptimo pH para crecimiento es generalmente 1.3 – 2.0. Existen cepas mesófilas y moderadamente termófilas. *Leptospirillum* forma un linaje distinto dentro del *phylum* Nitrospira. Ampliamente distribuido en ambientes naturales e industriales donde la oxidación acelerada de minerales sulfuros crea ecosistemas ácidos, ricos en metales.

Leptospirillum ferrooxidans Hippe 2000, 503^{VP} (ex Markosyan 1972, 26).

fer.ro.ox' i.dans. L. n. *ferrum* iron; M.L. v.*oxido* oxidize; M.L. part. adj. iron-oxidizing.

Vibrios (0.9-1.1 um) y espiralados (longitud variable) son los más comunes, aunque ocasionalmente pueden encontrarse de forma coco y pseudococo. Motilidad a través de un único flagelo polar. Quimiolitótrofo obligado y autótrofo. Estrictamente obligado. Utiliza hierro ferroso o hierro contenido en sulfuros minerales como única fuente de energía. Temperatura óptima 30 – 37 °C; rango de crecimiento <10 –

45°C. pH óptimo 1.3 – 2.0; mínimo pH: 1.1. Ampliamente distribuido en ambientes extremadamente ácidos (pH < 3), ricos en metales y en operaciones industriales de lixiviación mineral (Schippers, 2007).

Cepas tipo: L15, ATCC 29047, DSMZ 2705.

Leptospirillum thermoferrooxidans Hippe 2000, 503^{VP}
(Effective publication: Golovacheva, Golyshina, Karavaiko, Dorofeev, Pivovarova and Chernykh 1992, 749).

ther' mo.fer.ro.ox' i.dans. Gr. adj. *thermos* hot; L. n. *ferrum* iron; M.L. v. *oxido* oxidize; M. L. part. adj. *thermoferrooxidans* hot iron-oxidizing.

Forma vibrio (1.5 – 2.0 x 0.2 – 0.5 µm) y espiral (2.0 – 3.0 x 0.2 – 0.5). motiles por medio de un único flagelo polar. Quimiolitótrofo obligado y autótrofo. Estrictamente aerobio. Utiliza hierro ferroso como única fuente de energía, pero no hierro contenido en sulfuro mineral. Óptima temperatura de crecimiento 45 – 50 °C; rango de crecimiento 30 – 55 °C. Óptimo pH 1.65 – 1.90; mínimo pH 1.3. Porcentaje de similaridad genética con *L.* (Schippers, 2007).

Cepa tipo: L-88.

2.3.4. Microbiología de microbios oxidantes de hierro.

El artículo de investigación titulado “*Studies on the chemoautotrophic iron bacterium Ferrobacillus ferrooxidans*” de Melvin Silverman & Donald Lundgren es hasta ahora el trabajo más citado en artículos de investigación sobre microorganismos acidófilos, con más de 1000 citas.

Silverman & Lundgren (1959), describieron un medio de cultivo líquido mejorado denominado 9K, el cual es utilizado hasta hoy en día para aislar nuevos microorganismos y realizar pruebas de oxidación y biolixiviación de minerales. Pero, según Hallberg & Johnson (2007), la desventaja de este medio de cultivo es que la utilización de una alta concentración de hierro,

inhibe el crecimiento de otros microorganismos oxidantes de hierro diferentes a *A. ferrooxidans*.

Tuovinen (1973), describió un medio de cultivo para *Acidithiobacillus ferrooxidans* soportado en filtros de membrana sobre agar de ion ferroso (Fe^{2+}), la eficiencia de este medio varía según el tipo de membrana, agar y el pH del medio de cultivo (Johnson, 1995)

Manning (1975), describió un medio de cultivo para poder aislar microorganismos oxidantes de hierro (medio ISP) y bacterias acidófilas heterótrofas (medio GSYE) a partir de aguas acidas de mina (AMD). La limitante es la reproducibilidad y robustez del método en otras circunstancias, además algunas cepas de *A. ferrooxidans* crecen más rápidamente que otras y este medio sólido es más exitoso cuando se siembra poblaciones mixtas de acidófilos autótrofos y heterótrofos que poblaciones puras de *A. ferrooxidans* (Johnson, 1995)

El mayor experto en aislamiento de microbios acidófilos hierro oxidantes es el Dr. Barrie Johnson de la Universidad de Wales, él ha descrito varios métodos de aislamiento como, por ejemplo:

Medio FeTSB (Johnson *et al*, 1987), el cual es muy efectivo para el aislamiento de *Acidithiobacillus ferrooxidans* mixótrofo, ya que uno de los componentes es TSB (contiene glucosa). Mediante este método se han descrito varias especies acidófilas entre heterótrofas y mixótrofas. Sus principales componentes son: Hierro ferroso heptahidratado 25mM, TSB 0.025%, sulfato de amonio 0.18% y sulfato de magnesio heptahidratado 0.07% a pH 2.5.

Durante la formulación y utilización de este primer medio de cultivo (FeTSB médium), se observó que una reacción inhibitoria del crecimiento de los microorganismos es la producción de acidos orgánicos como el ácido cítrico que es producto del hidrólisis ácida del agente solidificante (Agar o

agarosa). Para resolver este detalle, se formuló una nueva preparación de medio de cultivo denominado: Medio FeO.

Medio FeO, es un medio de doble capa, muy útil para aislar bacterias acidófilas quimiolitótrofas. El punto crítico de la preparación de este medio es la inclusión de la bacteria *A. cryptum* la cual es la responsable del consumo de ácidos orgánicos que producen la inhibición de los microbios quimiolitótrofos. Los componentes en la primera capa (abajo) son: TSB como fuente de carbono, sulfato de amonio, sulfato de sodio, fosfato de potasio, agarosa y la se acidiona bacteria acidófila organotrófica *Acidiphilium cryptum*, luego se adiciona la segunda capa (arriba) con los siguientes componentes: sulfato de hierro, sulfato de amonio, sulfato de magnesio y fosfato de potasio, agarosa (Hallberg & Johnson, 2007) .

2.3.5. Biooxidación de hierro ferroso

El hierro es un elemento relativamente abundante en el universo y está presente en el sol y en muchas estrellas, es el cuarto elemento más abundante y el segundo metal después del aluminio, con una abundancia estimada de ~5% (Abbapour *et al*, 2014).

El hierro no solo es importante para las actividades humanas (el procesamiento de hierro para propósitos industriales abarca cerca del 95% de la producción mundial de metal), pero también es un elemento crucial para las células vivas de los dominios porque es incorporado como un factor en muchas metalo-proteínas involucradas en vías metabólicas vitales (Ilbert & Bonnefoy, 2013).

El hierro es un metal de transición: su símbolo químico es Fe. Punto de fusión de hierro es 1536°C, punto de ebullición es cerca de 3000°C y su densidad es 7.87 g.cm⁻³. El hierro puede existir en varios estados de oxidación (de -2 a +6), sin embargo, las principales formas que ocurren naturalmente son el hierro ferroso o el hierro férrico (Fe(II) o Fe(III)), respectivamente (Klausner & Rouault, 1996).

La solubilidad y reactividad del hierro dependen fuertemente sobre el pH, la oxidación química espontánea de hierro puede ser rápida a pH neutro mientras a pH bajo esta oxidación abiótica ocurre muy lentamente. En ambientes que contienen oxígeno, el hierro es rápidamente oxidado a partir del Fe(II) a Fe(III). Iones de hierro (III) tiene una baja solubilidad (cerca de 10^{-17} M), haciendo al hierro menos biodisponible a pH neutro que a pH ácido (Klausner & Rouault, 1996; Morgan & Lahav, 2007 ; Johnson *et al*, 2012). Hierro es esencial para muchas formas de vida. Algunos organismos como *Lactobacillus plantarum* no requieren hierro para crecer (Archibald, 1983) Muchas bacterias requieren concentraciones pequeñas (milimolar) de hierro intracelular y el cuerpo humano contiene de 4 a 5 g de hierro.

Este metal es una parte integral de un número de proteínas y enzimas. Los dos estados de oxidación del hierro (Fe(II) y Fe(III)) son adecuados para numerosas reacciones bioquímicas. Hierro es un importante cofactor en varias proteínas requeridas para un largo rango de procesos metabólicos como (i) el transporte, almacenaje y activación de oxígeno molecular, (ii) la activación y descomposición de peroxidasas, (iii) la reducción de ribonucleótidos y di-nitrógeno y (iv) la transferencia de electrones a través de una variedad de portadores de electrones con una amplia gama de potenciales redox (Beard J, 2001).

Microorganismos acidófilos utilizan más adecuadamente el Fe(II) que neutrófilos. Mientras un número de oxidantes de hierro (II) están siendo identificados, la comprensión de las vías de oxidación de Fe(II) recién está iniciando. Este es principalmente debido al pobre rendimiento celular con Fe(II) como donante de electrones y a la falta de un sistema genético eficiente en estos microorganismos. Además, incluso si la capacidad de usar Fe(II) con fines energéticos está generalizada, su oxidación es un verdadero desafío tanto para los acidófilos como para los neutrófilos debido a la química del hierro. Primero, a $\text{pH} > 5$, Fe(II) es rápidamente oxidado por O_2 mientras este es soluble y más estable a $\text{pH} < 4$ en condiciones óxicas. Por lo tanto, los neutrófilos tienen competencia con la oxidación espontánea de

hierro (II) libre y ser capaz de oxidar las varias formas de complejos de Fe(II) que tienen diferentes potenciales de reducción (Hedrich *et al*, 2011) . Las ‘bacterias de hierro’ son una colección de procariotas morfológicamente y filogenéticamente heterogéneas. Mientras especies de bacterias oxidantes del hierro pueden ser encontrados en muchos diferentes phyla, más son afiliados con las Proteobacteria. Los últimos pueden ser divididos en 4 principales grupos fisiológicos: (i) acidófilos, aeróbicos, oxidantes de hierro (ii) neutrófilo, aeróbicos, oxidantes de hierro (iii) neutrófilo, anaerobio, oxidantes de hierro-dependiente de nitrato, y (iv) fotosintético anaerobio, oxidante de hierro (Hedrich *et al*, 2011) .

Algunas especies (mayormente acidófilos) pueden reducir hierro férrico como también oxidar hierro ferroso, dependiendo sobre las prevalencias de condiciones ambientales (Emerson *et al*, 2010).

La oxidación de hierro ha sido evaluada extensamente en el organismo modelo extremo-acidófilo *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 19859 en los rangos de pH de 2.5 – 7.0 por Meruane & Vargas (2003), sus resultados mostraron que la inhibición de la actividad de oxidación de hierro por *A. ferrooxidans* fue observada a valores de pH por encima de 3.0, parcialmente enlazada por la formación de precipitados de hierro férrico, el cual aparentemente dificulta los procesos de transporte en la superficie celular. A un pH sobre 5.0, predomina la oxidación química sobre la oxidación bacteriana de hierro ferroso, y este no es posible para evaluar la actividad de oxidación. La oxidación bacteriana de hierro ferroso comienza a ser relevante y predomina sobre la oxidación química a pH menor a 5.0. La inhibición de actividad de oxidación bacteriana fue observada a pH sobre

2.5 es parcialmente enlazada a la formación de una capa de precipitados de óxido férrico sobre la bacteria, el cual dificulta la difusión de protones. Es posible obtener mejoras en la actividad de oxidación bacteriana específica en el rango de pH 2.5 – 5.0 si una baja concentración de hierro ferroso es usada en el experimento.

2.3.6. Extracción de ADN a través de membranas de sílica gel

Este es un método de extracción de ácidos nucleicos de fase sólida, puede ser encontrado en muchos de los kits comerciales de extracción de ADN y permite una purificación rápida y eficiente, comparada a métodos convencionales (como método fenol-cloroformo).

Según describen Tan & Chin (2009) y Ali y cols (2017): El sistema de fase sólida absorberá el ácido nucleico “ADN” en el proceso de extracción dependiendo del pH y concentración de sales del buffer. El proceso de absorción está basado en los siguientes principios: interacción de enlace de hidrógeno con una matriz hidrofílica bajo condiciones caotrópicas, intercambio iónico bajo condiciones acuosas por medio de un intercambio aniónico, y mecanismos de afinidad y peso de exclusión.

Cuatro pasos claves están involucrados en la extracción de fase sólida, son: lisis, absorción de ácidos nucleicos, lavado y elución.

El paso inicial en un proceso de extracción de fase sólida es para condicionar la columna para la absorción de la muestra, puede ser logrado por el uso de un buffer a un pH determinado para convertir la superficie o grupos funcionales en una forma química particular. Luego, la muestra, la cual está siendo degradada por el uso del buffer de lisis es aplicada a la columna. El ácido nucleico “ADN” será absorbido a la columna con la ayuda del pH alto y concentración de sales de la solución de enlace. Otros componentes, como proteínas pueden tener un fuerte enlace con la superficie de la columna. Estos contaminantes pueden ser removidos en el paso de lavado por el uso del buffer de lavado conteniendo un agente competitivo. Para el paso de elución, buffer TE o agua es introducido para liberar el ácido nucleico “ADN” a partir de la columna, y ser colectado en un estado purificado en un microtubo.

En biominería, la extracción de ADN ha sido realizado por ambos métodos: basados en membrana de sílica gel (Ding *et al*, 2011; Jahani *et al*, 2015; Liu *et al*, 2016) y fenol-cloroformo (Zeng *et al*, 2008), pero antes de realizar el método se realiza un pre-tratamiento para poder remover metales, por

ejemplo, lavados con citrato de sodio o PBS para remover agentes quelantes (Escobar *et al*, 2008; Jaramillo *et al*, 2012).

2.3.7. Amplificación por PCR en punto final

Según Garibyan & Avashia (2013): PCR es un simple y elegante ensayo enzimático, el cual permite la amplificación de un fragmento de ADN específico a partir de un complejo pool de ADN, el Dr. Kary Mullis, quien descubrió el ensayo de PCR, declaró: *'te permite elegir la pieza de ADN que te interesa y tener todo lo que quieras'*. PCR puede ser realizado usando una fuente de ADN a partir de una variedad de tejidos y organismos, incluyendo sangre periférica, piel, cabello, saliva y microbios. Solo una pequeña cantidad de ADN es necesario para que la PCR permita generar una alta cantidad de copias. Por esta razón, PCR es un ensayo sensible.

Cada ensayo de PCR requiere la presencia de un templado de ADN, oligonucleótidos, nucleótidos, y la enzima ADN polimerasa. La enzima ADN polimerasa es la enzima clave que enlaza nucleótidos individuales para formar el producto de PCR. Los nucleótidos incluyen las 04 bases nitrogenadas: adenina, timina, citosina y guanina (A, T, C y G), que son encontrados en el ADN. Estos actúan como bloques de construcción que son utilizados por la ADN polimerasa para crear el producto resultante de la PCR. Los primers en la reacción especifican el producto de ADN exacto que se va a amplificar. Los cebadores son fragmentos cortos de ADN con una secuencia definida complementaria al ADN objetivo que se debe detectar y amplificar. Estos sirven como un punto de extensión para la construcción de la ADN polimerasa.

Los componentes mencionados anteriormente se mezclan en un microtubo y se colocan en una máquina que permite que se produzcan ciclos de amplificación de ADN en tres pasos básicos. La máquina es esencialmente un termo-ciclador. Este tiene un bloque térmico con agujeros, en el que se insertan los tubos de ensayo o placas que contienen la mezcla de reacción de PCR. La máquina eleva y baja la temperatura del bloque en pasos discretos, precisos y programados previamente. La solución de reacción se calienta

primero por encima del punto de fusión de las dos cadenas de ADN complementarias del ADN objetivo, lo que permite que los filamentos se separen, un proceso denominado desnaturalización. Luego se baja la temperatura para permitir que los primers específicos se unan a los segmentos de ADN diana, un proceso conocido como hibridación o annealing. La hibridación entre los primers y el ADN objetivo ocurre solo si son complementarios en secuencia (por ejemplo, unión A a T). La temperatura se eleva nuevamente, momento en el que la ADN polimerasa puede extender los cebadores mediante la adición de nucleótidos a la cadena de ADN en desarrollo. Con cada repetición de estos tres pasos, el número de moléculas de ADN copiadas se duplica.

2.3.7.1. Análisis del producto de PCR.

Existen dos métodos para visualizar los productos de PCR: (1) coloreando el producto de ADN amplificado con un colorante químico como bromuro de etidio, el cual se intercala entre las dos cadenas de ADN, (2) etiquetando los primers de PCR o nucleótidos con colorantes fluorescentes previo a la amplificación de PCR. El método más ampliamente usado para analizar el producto del PCR es el uso de electroforesis en gel de agarosa, el cual separa el producto de ADN en base a su peso y carga. La electroforesis en gel de agarosa es el método más fácil de visualización y análisis del producto de PCR. Esto permite la determinación de la presencia y el tamaño del producto de PCR. Un conjunto predeterminado de productos de ADN con tamaños conocidos están corriendo simultáneamente sobre el gel con un marcador molecular estandarizado para ayudar a determinar el tamaño del producto (Ishmael & Stellato, 2008).

Esta técnica de PCR es muy útil para el estudio de microorganismos acidófilos, como, por ejemplo, el estudio de Escobar y cols (2008), que implementó una técnica para detección de *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans* por PCR a una sensibilidad de 10^5 células por mililitro de muestra.

2.3.8. Análisis bioinformático..

Determinar y verificar la identificación de una especie bacteria se realiza a través del secuenciamiento de ADN, introducida por Frederick Sanger en 1977.

El secuenciamiento de ADN tipo SANGER es parecida a una reacción de PCR de punto final con la diferencia de que se añade nucleótidos marcados con fluoróforos y la visualización se realiza a través de una electroforesis capilar. El producto de ello, es un archivo denominado electroferograma en el cual se muestra los picos consecutivos de los nucleótidos formando en su conjunto la secuencia de ADN evaluada (Shendure *et al*, 2017)

Posteriormente a tener la secuencia de ADN, se procede a caracterizar la secuencia para poder identificar la especie bacteriana en estudio. Para ello se realizan: análisis de secuencias con el software bioinformático BLAST y análisis filogenético.

BLAST tiene un algoritmo heurístico basado en el alineamiento local de secuencia. Este software compara la secuencia ‘problema’ contra una gran cantidad de secuencias ubicadas en su propia base de datos. El algoritmo encuentra las secuencias que tienen mayor similitud o identidad con la secuencia problema, nos muestra su significancia, a través de valor e-value (Camacho *et al*, 2009).

Para fines prácticos, cuando se analiza la secuencia problema de 16S rRNA con BLAST y el porcentaje de similitud es mayor a 98.65% con un valor e-value cercano a 0, podremos decir que hemos identificado la especie microbiana.

El análisis filogenético, se fundamenta en la caracterización evolutiva de la secuencia problema para explicar con que clado se relaciona cercanamente. Los métodos de reconstrucción filogenética se basan en caracteres o en distancias, entre ellos: Máxima probabilidad, Máxima parsimonia, UPGMA y Neighbor Joining. Para poder generar un

análisis filogenético primero debemos generar una pequeña base de datos con secuencias de cercana similitud.

Luego, realizar un alineamiento múltiple y uniformizar la cantidad de nucleótidos a evaluar en el análisis. Por último realizar la construcción filogenética en base a uno de los métodos mencionados.

Actualmente el método más utilizado es el Neighbor Joining. Este método fue propuesto por Saitou & Nei (1987), basado en el concepto de la teoría de la evolución neutral. El algoritmo requiere conocer la distancia entre cada par de taxa para formar el árbol. El método de distancia utilizado por lo general es el 2-Kimura. El método Kimura 2-parameter distance, toma en cuenta la tasa de sustitución transicional y transversal, con lo cual se asume que las frecuencias de los 4 nucleótidos son los mismos y las tasas de sustitución no varían entre ellos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Diseño de Investigación

Se plantea un estudio experimental, uni-factorial.

Este estudio tendrá una parte cualitativa-descriptiva para las etapas de aislamiento, identificación molecular, y una parte cuantitativa-experimental en la etapa de tolerancia a arsenito, biooxidación de hierro ferroso, biooxidación y cianuración por comparaciones de consorcios.

3.2. Ambiente temporal y espacial

Las muestras fueron colectadas de 3 distintos puntos de muestreo: La muestra de Cobre fue recolectada de una mina artesanal donde extraen minerales de cobre como chalcocita, calcopirita y bornita; se encuentra ubicada a 30 minutos rumbo este del distrito de Acarí, perteneciente al eje minero Nasca-Acarí, provincia de Caraveli, departamento de Arequipa.

En esta zona de la región costa, las precipitaciones son muy bajas o casi nulas durante el año, por lo que no se evidenció aguas ácidas de mina. La muestra colectada fue mineral de cobre de baja ley.

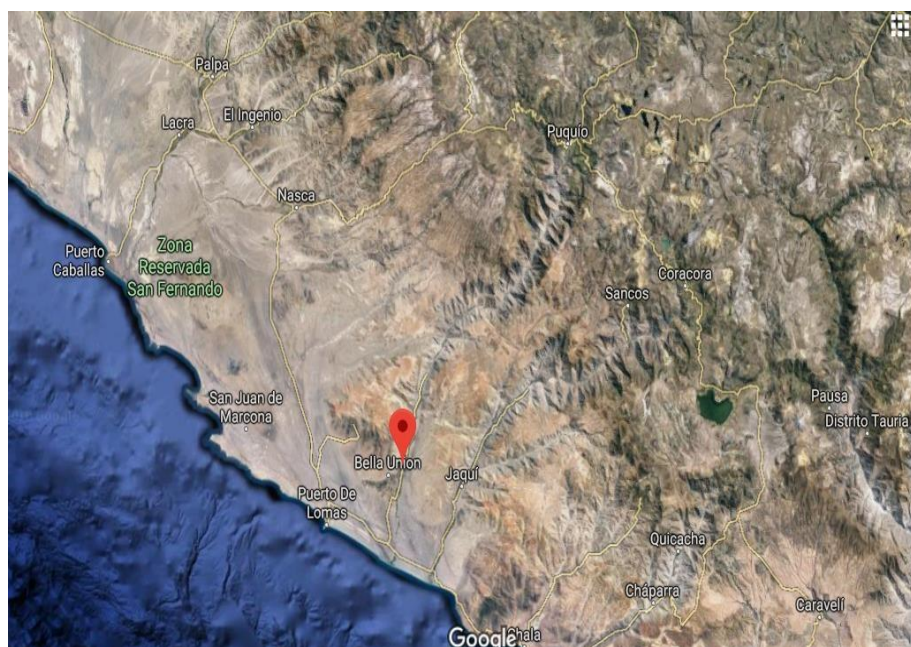


Figura 7. Ubicación geográfica del distrito de Acarí, Arequipa.

La muestra de Plata, fue recolectada de una mina perteneciente a la gran minera, denominada Pan American Silver, sede Huarón, ubicada en el distrito de Huayllay, en el departamento de Pasco. En esta unidad minera, a más de 4,500 m.s.n.m si se evidenció la presencia de aguas ácidas de mina, pero por motivos privados sólo se procedió a recolectar muestras de mineral sólido de baja ley de Plata.



Figura 8. Ubicación geográfica de la Minera PanAmerican Silver – Unidad Huarón, departamento de Pasco.

La muestra de oro, fue recolectada de la minera ecuatoriana EXPAUSA ubicada en el caserío Camilo Ponce, cantón (distrito) de Machala, provincia del Oro menos de 400 m.s.n.m., en esta región las precipitaciones son muy frecuentes, se evidenció la presencia de agua de mina con un pH de 5.0. En esta unidad minera, igualmente por motivos privados sólo se recolectó mineral sólido.

Todas las muestras fueron recolectadas en frascos o envases estériles.

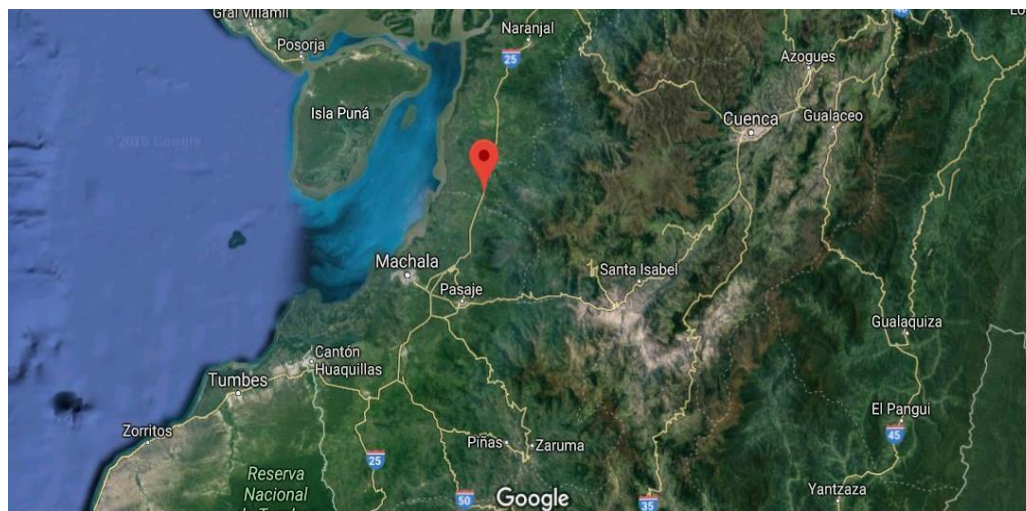


Figura 9. Ubicación geográfica de la minera ecuatoriana EXPAUSA, ubicada en el caserío Camilo Ponce (señal roja), en la provincia del Oro, Ecuador.

3.3. Variables de Estudio

Las variables a tomar en cuenta serán:

- 3.3.1. Densidad celular.
- 3.3.2. Tiempo (horas o días).
- 3.3.3. Concentración de Fe^{2+}
- 3.3.4. Concentración de Fe^{total}

3.4. Población y Muestra de Estudio

✓ **Población:**

Comunidad microbiana acidófila presentes en pasivos mineros.

✓ **Muestra:**

Consortios microbianos acidófilos pasivos mineros de cobre, oro, polimetálicos y drenajes ácidos.

3.5. Instrumentos

El presente estudio se realizó en los laboratorios de Microbiología y Biotecnología Molecular de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y del Laboratorio de Microbiología e Inmunología de la Universidad Nacional Federico Villarreal.

3.5.1. Equipos:

- Cámara fotográfica ® NIKON L830
- Balanza analítica ® Sartorius

- Microscopio óptico eléctrico Leica®
- Homogenizador rotatorio horizontal LabMedic®
- Medidor de pH de sobremesa Hanna®
- Centrífuga ThermoScientific® Sorvall Legend con para tubos de 50 mL.
- Bomba de vacío
- Refrigeradora 4°C® Bosch
- Congeladora de -20°C® Electrolux
- Termociclador® PeqLab
- Sistema de Electroforesis® BioRad
- Visualizador de productos de PCR® Invitrogen
- Horno eléctrico® Memmert
- Autoclave® Memmert
- Cuantificador de ADN Qubit® Invitrogen

3.5.2. Reactivos:

- Sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) Merck®
- Sulfato amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) Merck®
- Sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Merck®
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado (99%) Merck®
- Buffer para calibrar pH 4.0 y pH 10.0 Hanna®
- Dicromato de Potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) Sigma-Aldrich®
- Difenilamina sal de bario Sigma-Aldrich®
- Kit para extracción de ADN® Promega®
- Etanol absoluto grado molecular ApplieChem®
- Kit para PCR convencional Taq Platinum Invitrogen®
- Cebadores/primers para PCR convencional IdtDNA®
- Solución de Nucleótidos ThermoScientific®
- Agarosa Cleaver Scientific®
- Sybr safe Invitrogen®
- Marcador molecular de 100 pb ThermoScientific®
- Buffer Loading 6x ThermoScientific®

3.5.3. Materiales

- Frascos de 1 L estériles.
- Cooler o tecnopor
- Icepack
- Guantes de latex Medilatex®
- Mascarilla N95 3M®
- Pipetas de 1mL, 5mL, 25 mL Giardino®
- Propipeta
- Micropipetas BioHit® de 10uL, 20uL, 100uL y 1000uL
- Tips Axygen® de 10uL, 20uL, 100uL y 1000uL.
- Probeta Brand® de 100 mL y 1000 mL.
- Matraz Brand® de 250 mL, 500 mL y 1L
- Vaso de Precipitado Brand® de 10 mL, 500 mL y 1 L.
- Tubo de titulación de 25 mL Giradino®
- Cintas de pH, rango 0 – 14 Merck®
- Camara de Neubauer Marienfeld®
- Láminas cubreobjeto Marienfeld®.
- Algodón esteril.
- Microtubos de 0.2 mL Axygen®
- Microtubos de 0.6 mL Axygen®

3.6. Procedimientos

3.6.1. Colecta de muestras y caracterización de la muestra.

Para el presente estudio se realizó la colecta de muestras minerales sólidas, no se recolectó muestras líquidas.

Las muestras fueron colectadas en frascos estériles de 1 L de capacidad. El transporte de estas muestras se realizó a temperatura ambiente y fueron llevadas al Laboratorio para su procesamiento.

Todas las muestras fueron caracterizadas químicamente por la técnica ICP (Espectroscopía de Plasma).

El análisis de las muestras de plata y oro fueron proporcionadas por las empresas mineras, respectivas. La muestra de cobre no fue analizada químicamente.

Tabla 5. Análisis Químico del mineral polimetálico de Playa, proveniente de la minera PanAmerican Silver. Método utilizado ICP. Code VH-ME-ICP2. Análisis por ICP-OES agua regia).

Elemento Químico	Concentración encontrada en muestra
Plata (Ag)	83.9 ppm
Arsénico (As)	1,069 ppm
Cobre (Cu)	3,826.3 ppm
Hierro (Fe)	5.70%
Plomo (Pb)	527 ppm
Zinc (Zn)	3,937 ppm
Azufre (S)	2.26%



Figura No 10. Muestra del mineral polimetálico de plata de baja ley recolectado en la minera PanAmerican Silver.

Tabla 6. Análisis geológico del mineral de oro recolectado de la empresa Minera EXPAUSA (Ecuador). Analizado por Microscopía Electrónica de Barrido.

Especie Mineral	Número de partículas (p)	Porcentaje
Pirita (FeS ₂)	701 p	35.97%
Arsenopirita (FeAsS)	371 p	19.04%
Cuarzo (SiO ₂)	292 p	14.98%
Magnetita (Fe ₃ O ₄)	258 p	13.24%
Odinita (NaFe ₃ (SO ₄)(OH) ₆)	153 p	7.85%
Ilmenita (FeTiO ₃)	48 p	2.46%
Calcita (CaCO ₃)	41 p	2.10%
Tetradimita (Bi ₂ Te ₂ S)	38 p	1.95%
Ortoclasa (KAlSi ₃ O ₈)	26 p	1.33%
Calcopirita (CuFeS ₂)	21 p	1.08%
TOTAL	1949 p	100.00%

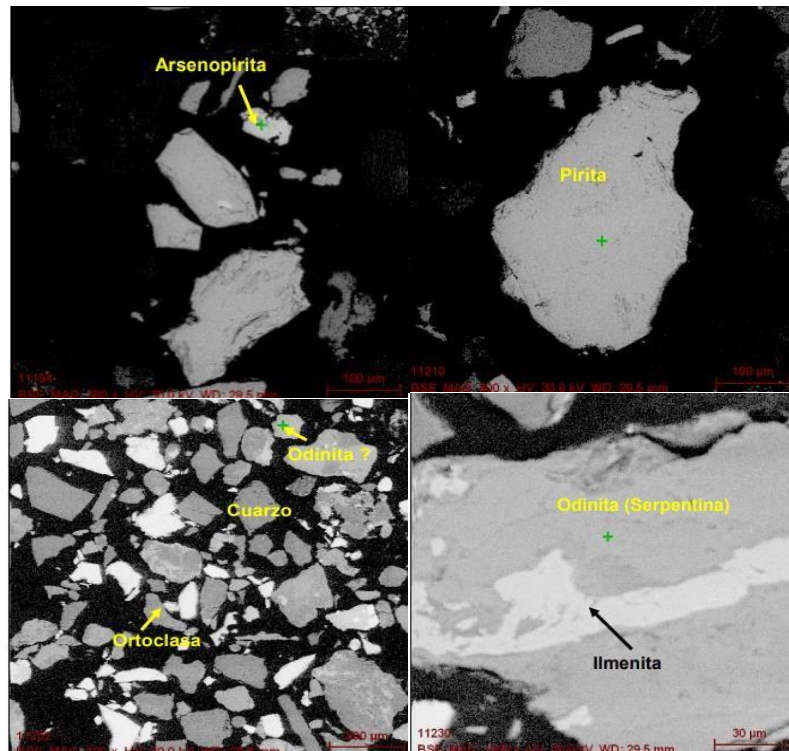


Figura 11. Microscopía electrónica de Barrido del mineral de la empresa EXPAUSA. Las partículas de arsenopirita y pirita tienen un 0.83% y 0.59% de partículas de oro ocluidas, respectivamente.



Figura 12. Muestra de cobre de alta ley recolectada de la Minera Artesanal en el eje Minero Nasca- Acarí.

3.6.2. Aislamiento de consorcios microbianos acidófilos mesófilos

3.6.2.1. Cultivo de enriquecimiento inicial

Las muestras obtenidas fueron procesadas por enriquecimiento e incremento de biomasa celular.

La proporción utilizada en el cultivo el enriquecimiento inicial para cada muestra fue de 20 g de mineral en 100 mL de Medio líquido.

Se utilizó el medio líquido 9K-Fe modificado para el aislamiento de consorcios microbianos extremo-acidófilos oxidantes de hierro siguiendo las recomendaciones de Ramírez y cols (2002) y Abanto y cols (2013). El medio líquido 9K modificado tiene la siguiente composición: 33 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.4 g/L K_2HPO_4 , 0.4 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 1.8, ajuste pH con ácido sulfúrico 10 N. Esterilización por filtración.

Para cada muestra mineral se incubó a temperatura ambiente con agitación de 180 rpm – 220 rpm y se realizaron monitoreos periódicos cualitativos de presencia o ausencia de crecimiento microbiano por un periodo de 30 días.

3.6.2.2. Purificación e Incremento de Biomasa

La purificación de los consorcios fue realizado a través de pasajes de cultivo de medio líquido a una proporción de 10% (v/v). El medio líquido utilizado tuvo la siguiente composición: 10 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.4 g/L K_2HPO_4 , 0.4 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 1.8, ajuste pH con ácido sulfúrico 10 N. Esterilización por filtración.

El monitoreo microbiano se realizó por conteo en una cámara de Neubauer. Para cada conteo el procedimiento fue el siguiente: se colectó 1 mL de cultivo líquido en un tubo de 2.0 mL, se centrifugó a 800 g por 15 minutos, luego se traspasó el sobrenadante a un nuevo tubo, y se centrifugó a 8,000 g por 15 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en agua acida (pH 1.8). Sólo 10 uL fue utilizado en la cámara de Neubauer. El conteo fue realizado a 40 X, se utilizó la lectura sistemática por conteo en cuadrante, siguiendo la fórmula:

$$\text{Cel/mL} = \text{Promedio de bacterias en los 5 cuadrantes} \times (\text{Volumen utilizado})^{-1} \times \text{Factor de Conversión} \times 25.$$

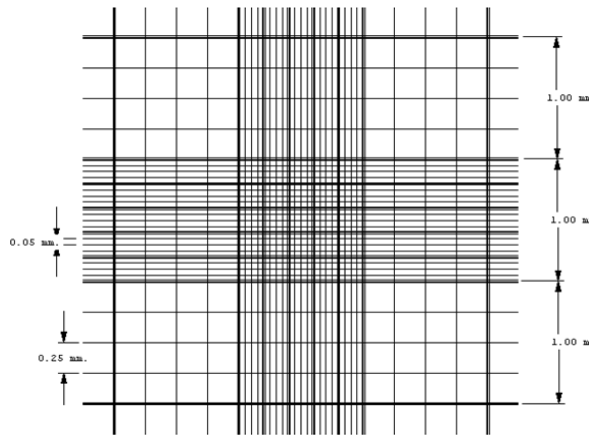


Figura 6. Representación de una Camara de Neubauer

3.6.3. Pruebas de biooxidación de hierro

Para las pruebas de oxidación de hierro de los consorcios microbianos aislados se realizaron conteos microbianos por cámara de Neubauer y determinación de la cantidad de ión hierro ferroso (Fe(II)) por titulación volumétrica en intervalos de tiempo.

Los consorcios microbianos fueron re-sembrados en medio MFeCi (Yarzabal *et al*, 2003) con la siguiente composición: 0.4 g/L (NH₄)₂SO₄, 0.4 g/L K₂HPO₄, 0.4 g/L MgSO₄·7H₂O, 0.3 g/L Citrato de sodio (C₆H₅Na₃O₇·2H₂O) y 10 g/L FeSO₄·7H₂O, pH 1.5. Se esterilizó en autoclave a 15 psi, 121 °C y 15 minutos. El uso de citrato de sodio es para evitar la precipitación de ión hierro III.

El protocolo de titulación de hierro ferroso utilizado fue implementado en la planta metalúrgica de Tamboraque para el Proceso Biotecnológico BIOX®:

Los componentes son:

- A) Solución extractiva: 300 mL de H₃PO₄ (85%), 300 mL de H₂SO₄ (98%), diluir hasta 2 Litros con agua destilada.
- B) Solución de indicador Difenilamina: 1 g de difenilamina sal de bario en 100 mL de H₂SO₄ (98%).
- C) Solución de Dicromato de Potasio (0.01 N): 4.4 g de dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇) en 1000 mL de H₂O destilada.

Las muestras fueron analizadas de la siguiente manera:

- Se recolectó 5 mL de muestra filtrada con papel filtro y colocar en un vaso matraz de 50 mL.
- Se adicionó 10 mL de solución extractiva.
- Luego se adicionó 4 gotas de la solución de difenilamina.
- Luego se tituló con solución de dicromato de potasio (0.01 N) hasta virar a color lila.
- Aproximadamente 1 gota de dicromato equivale a 0.065 g/L Fe³⁺.

La comparación en las pruebas de oxidación entre consorcios se realizó a través de la prueba de ANOVA de un factor en el software estadístico STATGRAPHICS 16.2-04 (<https://www.statgraphics.net/>).

3.6.4. Detección molecular de consorcios microbianos acidòfilos.

3.6.4.1.Extracción de ADN

Previamente, los cultivos de consorcios microbianos extremo- acidòfilo fueron enriquecidos en el medio líquido 9K-Fe.

Se colectó 50 mL de cultivo enriquecido en tubos falcon estériles libre de nucleasas (ARNasa y ADNasa) y se centrifugaron a 20,000 g por 15 minutos.

Luego, se realizaron dos lavados con PBS (pH 8.0) y un lavado con citrato de sodio (pH 8.0). Cada lavado se realizó con 30 mL de PBS y 15 mL de citrato de sodio a una velocidad de 20,000g por 15 minutos. Luego de los lavados, los pellets se diluyeron en 0.3 mL de agua acida pH 1.8 (Ramírez *et al*, 2002).

Las extracciones del ADN genómico de los consorcios microbianos extremo-acidòfilos aislados se realizaron con el kit GeneJet Whole Genomic DNA Purification (Promega®), según instrucciones del kit. En un tubo de 1.5 mL, se colocó 200 uL de muestra (previamente lavada) y 20 uL de solución de la enzima Proteinasa K, se homogenizó por vortex. Al mismo tubo se añadió 400 uL de solución de lisis celular, se homogenizó por pipeteo. Se incubó las muestras a 56°C a 600 rpm por 10 minutos.

Luego, se añadió 200 uL de etanol absoluto (96 – 100%) grado molecular y se mezcló por vórtex.

Se transfirió la mezcla preparada a un nuevo tubo con columna de sílica gel. Se centrifugó a 6,000g por 1 minuto a temperatura ambiente. Se descartó el tubo colector y se trasladó la columna de sílica gel a un nuevo tubo colector.

Se añadió 500 uL de solución de Buffer de Lavado I (con etanol absoluto añadido). Se centrifugó a 8,000g por 1 minuto a temperatura

ambiente. Se descartó el tubo colector y se trasladó la columna de sílica gel a un nuevo tubo colector.

Se añadió 500 solución de Buffer de Lavado II (con etanol absoluto añadido). Se centrifugó a 20,000g por 3 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el tubo colector y se traspasó la columna de sílica gel a un tubo de 1.5 mL. Se añadió 70 uL de solución de Buffer de elución en el centro de la columna para eluir el ADN genómico. Se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente y centrifugó a 8,000g. Se descartó la columna de sílica gel y se almacenó el tubo de 1.5 mL a -20°C.

3.6.4.2. Amplificación de marcadores específicos.

Para los consorcios microbianos se realizó dos ensayos de PCR a cada uno. La identificación de las dos principales especies: *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans* a través de cebadores específicos para cada especie. (Ver Tabla 4).

Tabla 4. Lista de Primers específicos utilizados en este trabajo. Según Escobar *et al* (2008). ^aSegún el genoma de *E. coli*.

Cebadores (Primers)	Secuencia (5'→3')	Sitio Blanco ^a
<u><i>A. ferrooxidans</i></u>		
F1_Thio	ATg CgT Agg AAT CTg TCT TT	120-139
R1_Thio	ggA CTT AAC CCA ACA TCT CA	1078-1097
<u><i>L. ferrooxidans</i></u>		
F1_Lepto	ggg TgA gTA ATA CAT ggg Tg	111-130
R1_Lepto	AAC TTg TCg CTg gCA gTC	1156-1173

La reacción de PCR se realizó con kit Taq Platinum Polymerase (Invitrogen®), para un volumen de 25 uL. Las condiciones de PCR fueron: 1 ciclo a 95°C por 5 minutos, 40 ciclos a 95°C por 1.5 minutos, 58.5°C por 1.5 minutos para *A. ferrooxidans* y 53°C por 1.5 minutos para *L. ferrooxidans*, y 72°C por 1.5 minutos, y por ultimo un ciclo a 72°C por 7 minutos en el equipo termociclador PeqLab®. Los

productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 2% teñido con colorante SybrSafe® Invitrogen en un transiluminador® Invitrogen.

3.6.4.3. Identificación Molecular

Los amplicones de PCR detectados fueron procesados para secuenciamiento de ADN.

A partir del gel de agarosa, se procedió a cortar el gel donde se encuentra el producto. Luego, el fragmento de gel fue purificado para obtener el amplicon puro.

Posteriormente, se procedió con el secuenciamiento de ADN con el equipo ABI3730xl con electroforesis capilar en MacroGen (Korea).

Las secuencias genéticas fueron evaluadas por análisis bioinformático. El electroferograma de las secuencias fueron analizadas para edición de errores con el programa Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>).

Luego se realizó un BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) en la base de datos del NCBI (Centro Nacional de Biotecnología de los Estados Unidos de América) y en el software Ez-Taxón (<https://www.ezbiocloud.net/>) para identificar las especies bacterianas. En Ez-Taxón con un valor de similaridad mayor de 98.50 se puede considerar como especie verdadera.

Posteriormente, se realizó el análisis de las secuencias para inferir a que clado pertenecen y a que clados se encuentran relacionados a través del software MEGA 7 (<https://www.megasoftware.net/>). El test filogenético utilizado fue el de Mínima Evolución, las distancias genéticas de las secuencias se calcularon con la formula Kimura-2 parametros y la construcción del árbol filogenético se realizó con el Método Neighbor-Joining con un bootstrap de 1000. Todas las secuencias de referencia fueron colectadas a partir de la base de datos del Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) del NCBI

(National Center of Biotechnology Information) de los Estados Unidos de America.

3.7. Análisis de datos

Los datos serán evaluados por estadística descriptiva, estadística, ANOVA (en caso sea necesario) y test de comparaciones múltiples (Prueba de Tukey) para los ensayos previamente descritos. Todos los datos serán procesados utilizando el software SPSS 15.0 para Windows.

IV. RESULTADOS.-

4.1. Cultivo de consorcios microbianos acidófilos.

4.1.1. Selección de microorganismos acidófilos hierro oxidantes.

De las 3 muestras minerales colectadas se obtuvieron consorcios microbianos acidófilos oxidantes de hierro luego de 6 semanas, los cuales fueron adaptados al crecimiento a temperatura ambiente y pH 1.8.

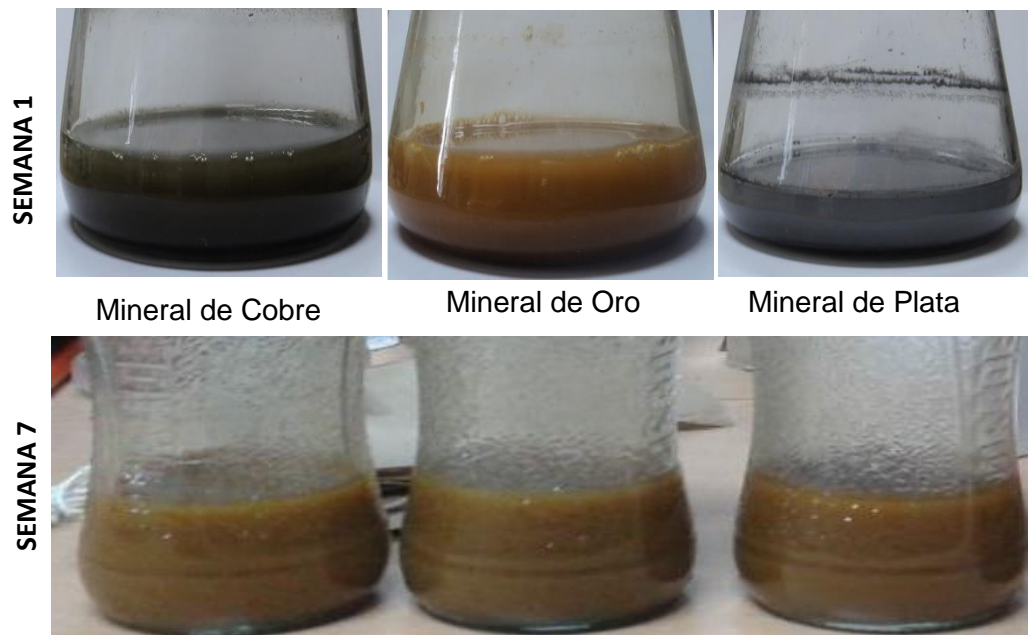


Figura 13. Siembra (A) y primer pasaje (B) durante el aislamiento de los 3 consorcios microbianos acidófilos oxidantes de hierro a partir de minerales.

El cultivo de enriquecimiento duró 6 semanas, a través de 3 pasajes. El cultivo inicial fue al 5% (w/v) (5 g de mineral en 100 mL de medio de cultivo) en medio 9K modificado. Los siguientes pasajes fueron al 10% (v/v) (10 mL de cultivo inicial en 90 mL de medio de cultivo). El primer pasaje fue a las 3 semanas y el segundo pasaje a las 4.5 semanas. Durante el primer pasaje no se observó la coloración rojiza, a partir del segundo pasaje se observó la coloración rojiza en los cultivos microbianos.

La visibilidad microbiana en el cultivo inicial fue dificultoso debido a la presencia del mineral y la cantidad de microorganismos fue muy

variable, no se describió una tendencia exponencial cuando se realizó el conteo de células. En los demás pasajes se observaron tendencia de crecimiento que se contrastó con el color naranja-rojizo que fue adquiriendo el medio de cultivo.

Se verificó presencia de bacterias Gram negativas en los 3 cultivos, a través de una coloración de Gram.

A partir del segundo pasaje, los pasajes posteriores se hicieron cada 4 días, con un inóculo al 10%.

El crecimiento en el medio sólido fue a los 7 días de incubación a temperatura ambiente. Se observó la formación de la coloración naranja-rojizo producto de la oxidación del hierro ferroso.

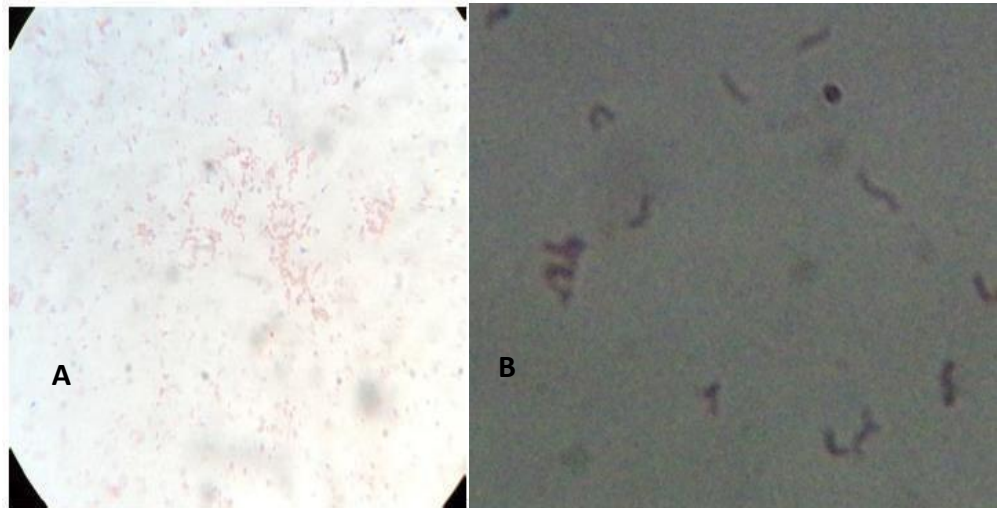


Figura 14. Coloración Gram. A. Se observa la presencia de bacilos Gram negativos, característico de *Acidithiobacillus ferrooxidans*. B. Presencia de bacterias gram negativas espiraladas, característico de *Leptospirillum*.

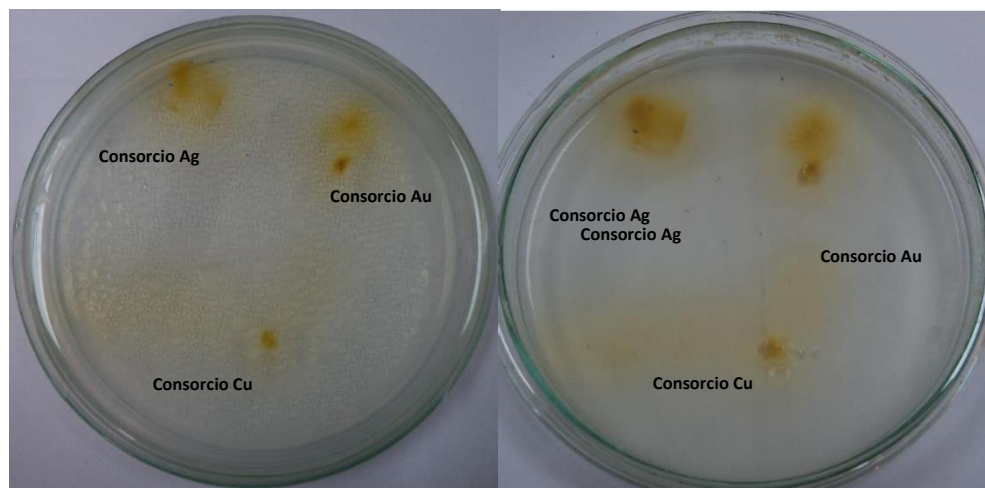


Figura 15. Aislamiento de microorganismos oxidantes de hierro en medio 9k sólido. A: a los 7 días de crecimiento. B: A los 10 días de crecimiento.

4.2. Evaluación de cinética de crecimiento y biooxidación de hierro ferroso.

Los cultivos aislados de los consorcios acidófilos fueron enriquecidos y las pruebas de oxidación se realizaron en cultivo inicial de 1×10^6 cel/mL.

Los 3 consorcios microbianos no mostraron diferencias significativas en su cinética de crecimiento. El tiempo de generación fue de 11,71 h, 10,94 h y 12,14 h para los consorcios de Ag, Au y Cu, respectivamente.

Debido a que las cinéticas de crecimiento no presentaron diferencias significativas entre los 3 consorcios aislados, se procedió a realizar la evaluación comparativa de la biooxidación de hierro ferroso entre los consorcios.

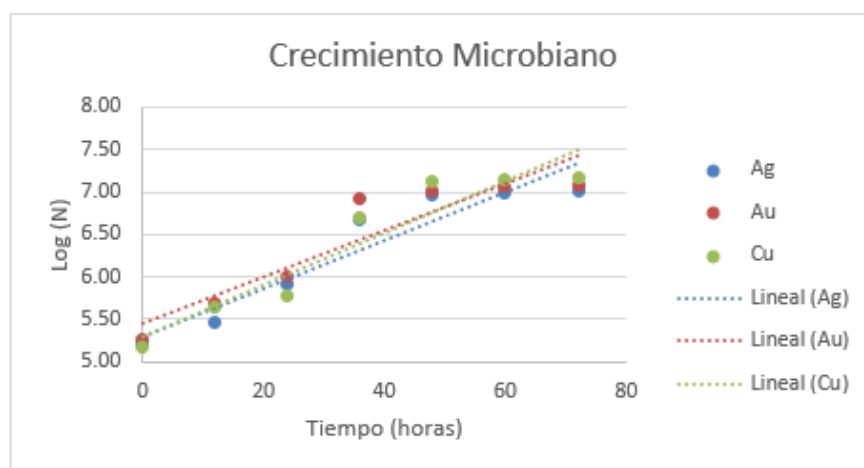


Figura 16. Crecimiento de los 3 consorcios microbianos durante 72 horas. No se observaron diferencias significativas en la cinética de crecimiento.

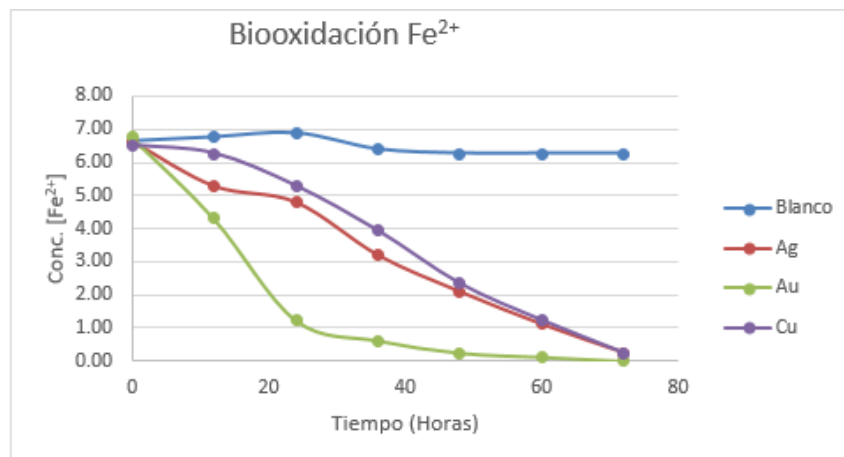


Figura 17. Evaluación de la biooxidación de hierro de los 3 consorcios microbianos aislados en 72 horas, a una agitación de 180 rpm en incubación a temperatura ambiente (~25°C)

Entre los consorcios aislados quien mayor tasa de oxidación presentó fue el consorcio aislado de mineral de oro, oxidando totalmente el hierro ferroso (6.5 g Fe²⁺) en 60 horas.

Por análisis de varianza se observó diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la oxidación de hierro de los 3 consorcios (Tabla 7).

Tabla 7. Evaluación comparativa de la oxidación de hierro por los 3 consorcios según análisis de varianza y prueba de rangos múltiples. Análisis realizado con el software Statgraphics versión 16.2-04, $p < 0.005$

CONSORCIO	SUB-GRUPO
Consortio Ag	A
Consortio Au	B
Consortio Cu	A
Control blanco	C

4.3. Detección molecular de bacterias acidófilas en los consorcios microbianos y secuenciamiento de ADN.

El ensayo de PCR se realizó posterior a la prueba de biooxidación de hierro ferroso, la concentración utilizada de ADN fue entre 100 -150 ng/uL.

En los 3 consorcios aislados en medio sólido se encontraron microorganismos tipo *Acidithiobacillus ferrooxidans* (978 pb) (Figura 23). Mientras que en los ensayos a partir de medio líquido sólo en el consorcio aislado a partir del mineral de oro se encontró la bacteria tipo *Leptospirillum ferrooxidans* (1063 pb) (Figura 24 y 25).

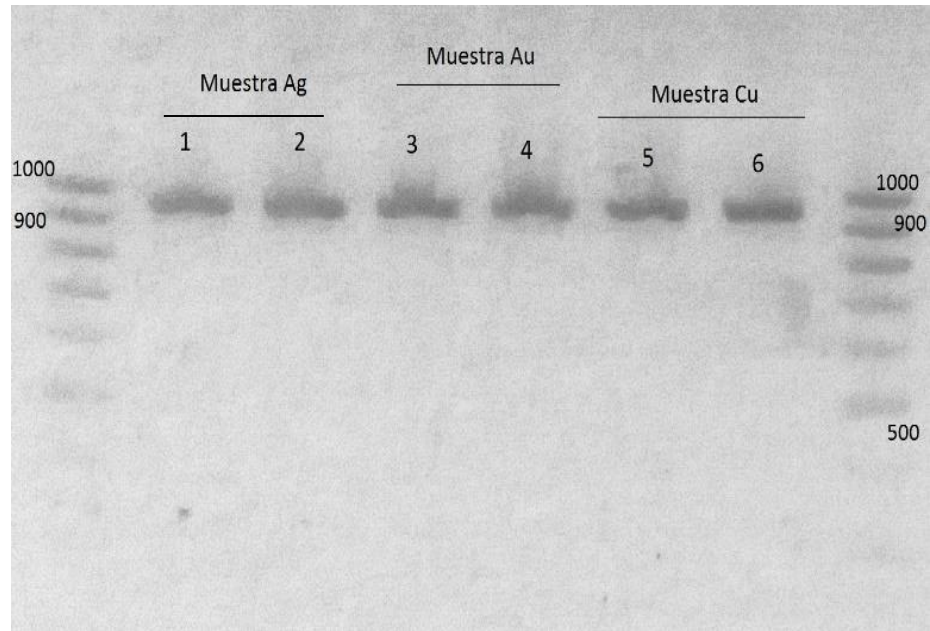


Figura 18. Ensayo de PCR para la detección de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (978 pb) siguiendo el protocolo de PCR de Blanca Escobar (2008).

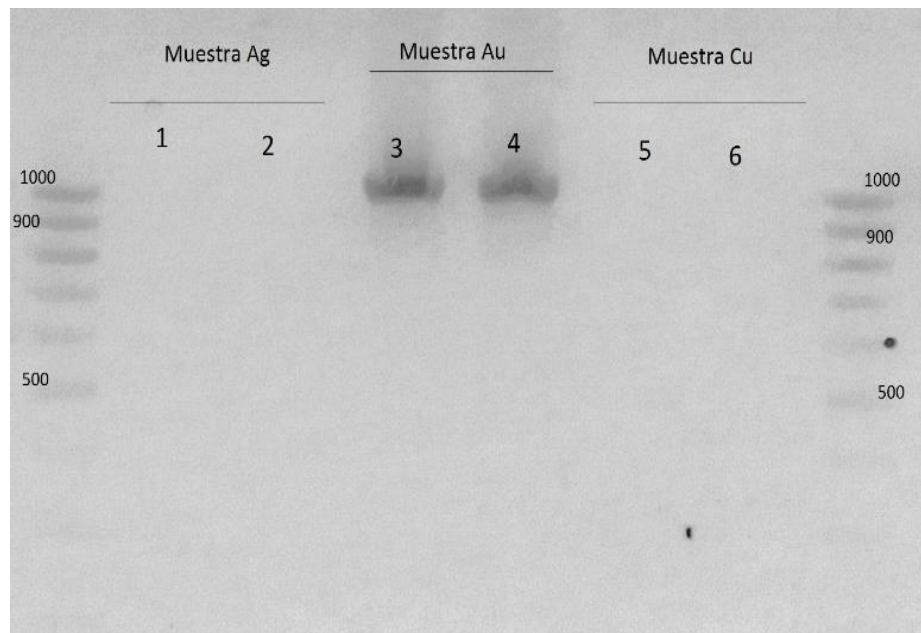


Figura 19. Ensayo de PCR para la detección de *Leptospirillum ferrooxidans* (1063pb), siguiendo el protocolo de PCR de Blanca Escobar (2008).

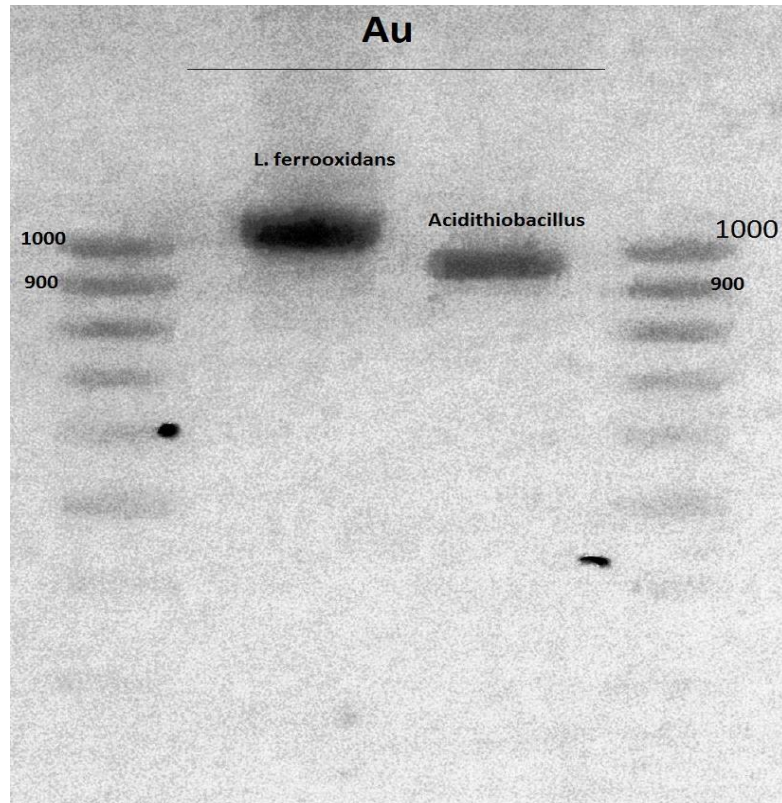


Figura 20. Detección molecular de *Leptospirillum ferrooxidans* (1063 pb) y *Acidithiobacillus ferrooxidans* (978 pb) en el consorcio microbiano de mineral de oro, siguiendo el protocolo de PCR de Blanca Escobar (2008).

Sólo para la muestra de consorcio microbiano de oro (Au) donde se evidenció la presencia de *A. ferrooxidans* y *L. ferrooxidans* se realizó el análisis de secuenciamiento y filogenia molecular. Se evidenció que la cepa aislada en medio sólido “LSM1490” tiene 98.78% de similaridad con la especie *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC23270 y la cepa aislada en medio líquido “LSM1491” tiene 98.80% de similaridad con la especie *Leptospirillum ferrooxidans* L15. Ambos análisis se realizaron mediante el software online EZ-taxon (<https://www.ezbiocloud.net/>). Se puede afirmar perteneciente a esta especie cuando la similaridad es mayor a 98.50%.

Estos resultados confirman y verifican los datos obtenidos por los ensayos de PCR.

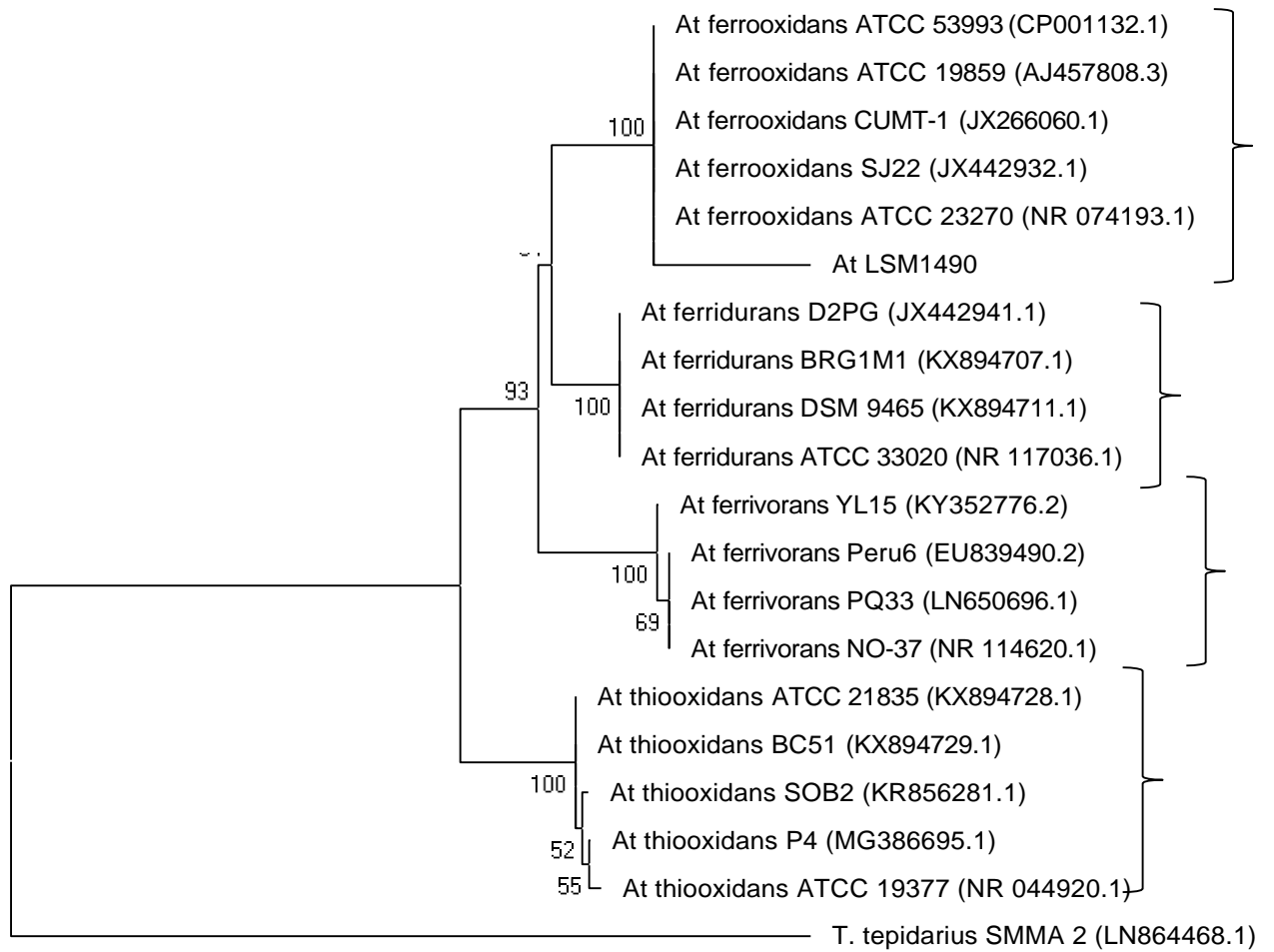


Figura 21. Arbol filogenético basado en el gen 16S rRNA de la cepa *At. ferrooxidans* LSM1490. La reconstrucción filogenética fue realizada con el test de evolución mínima y la construcción del árbol filogenético con un bootstrap de 1000. La barra de escala indica 0.01 sustituciones inferidas de nucleótidas por sitio.

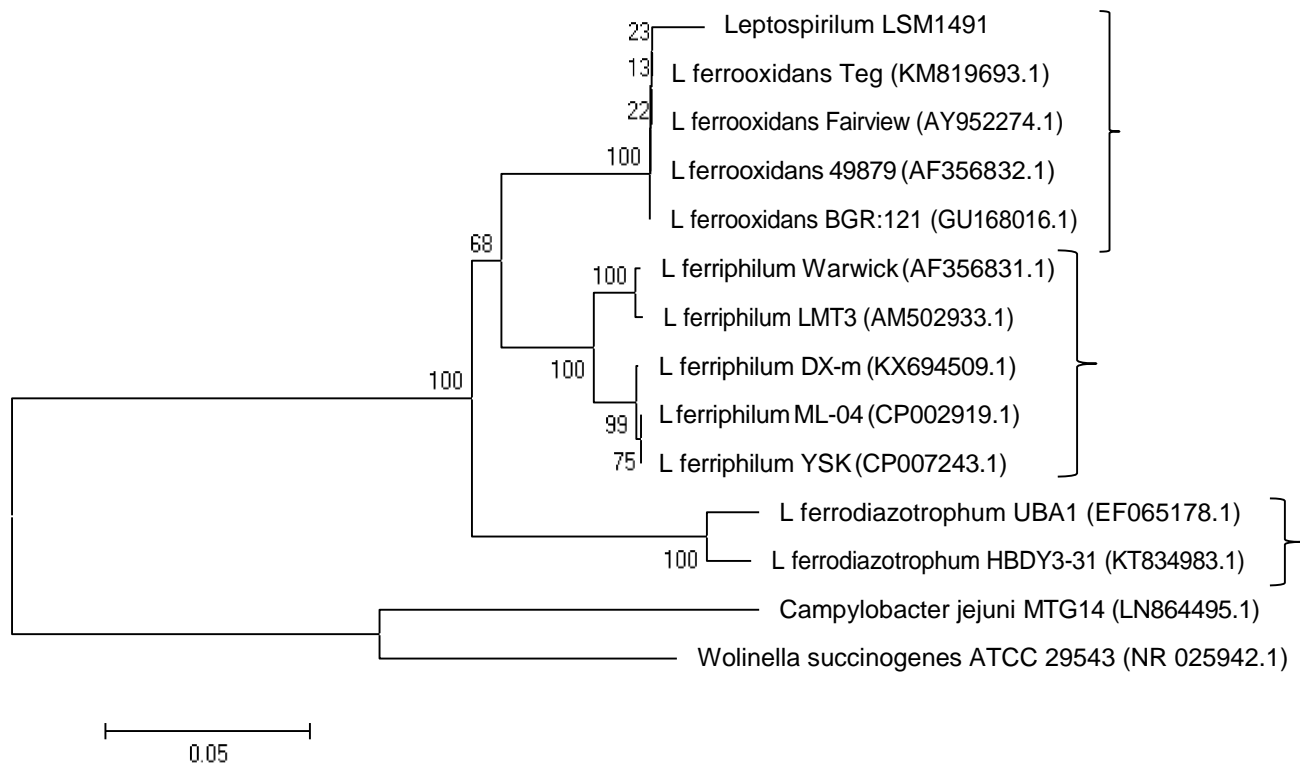


Figura 22. Arbol filogenético basado en el gen 16S rRNA de la cepa *L. ferrooxidans* LSM1491. La reconstrucción filogenética fue realizada con el test de Mínima evolución y la construcción del árbol filogenético con un bootstrap de 1000. La barra de escala indica 0.05 sustituciones inferidas de nucleótidos por sitio.

La cepa LSM1490 está muy fuertemente agrupado al clado de las especies de *Acidithiobacillus ferrooxidans* con un soporte significativo de 100 y está más cercanamente relacionado a los clados de las especies de *A. ferridurans* y *A. ferrivorans* que la especie *A. thiooxidans*.

La cepa LSM 1491 está muy fuertemente agrupado al clado de las especies de *Leptospirillum ferrooxidans* y más cercanamente relacionado al clado de *Leptospirillum ferriphilum* que al clado de *Leptospirillum ferrodiazotrophum*.

V. DISCUSIÓN

Generalmente, las investigaciones en Biominería comienzan con aislamientos de microbios y/o consorcios microbianos a partir de agua acida de mina encontrándose una diversidad microbiana menor a la de un suelo agrícola (menor a 10 especies) pero significativa.

En territorios muy secos o inhóspitos, la afluencia de agua es limitada con precipitaciones anuales menor a 4 mm de agua es muy poco probable encontrar y coleccionar aguas ácidas de mina. Sin embargo, se han descrito algunos aislamientos de bacterias acidófilas a partir de rocas minerales, encontrándose en todos los casos la bacteria modelo *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Mishra *et al*, 1983; Sugio *et al*, 2008; Nguyen *et al*, 2014) como también resultó en este trabajo de tesis. El motivo es que esta bacteria es de muy fácil crecimiento en medio líquido y en medio sólido. La mayoría de las formulaciones de cultivo (como medio 9K) están basadas en la microbiología de este microorganismo, el cual es catalogado como “bacteria modelo” en Biominería. Sin embargo, no todas las cepas de *Acidithiobacillus ferrooxidans* crecen en medio sólido, existen por lo menos dos razones para estas discrepancias: primero, variaciones de la cepa (algunas cepas de *Acidithiobacillus ferrooxidans* crecen más fácilmente en medio sólido), y segundo el hecho que este medio sólido es más exitoso cuando siembran poblaciones mixtas de autótrofos y heterótrofos que cultivos puros de *A. ferrooxidans* (Johnson, 1995; Johnson & Hallberg, 2007; Hallberg & Johnson, 2007). Otros acidófilos, requieren de algunos suplementos alimenticios para poder desarrollarse y conseguir aislamientos puros, como es el caso de *Leptospirillum ferrooxidans*, el cual es un microbio recalcitrante a la manipulación microbiológica y se a descrito que por lo general para su crecimiento se requiere esencialmente de pirita (fuente de energía) (Johnson & Hallberg, 2007). *L. ferrooxidans* y el resto de los microorganismos acidófilos oxidantes de hierro pueden crecer en medio líquido, pero en medio sólido resulta muy difícil o con resultado negativo, debido a la inhibición por los agentes solidificantes como el agar y la agarosa, basados en carbohidratos. Los carbohidratos en medio ácido producen ácidos carbónicos, principal causa de la inhibición de estos microorganismos quimiolitótrofos (Sánchez-Andrea *et al*, 2013)). Aunque Johnson *et al* (2005),

revolucionó el campo de la microbiología de acidófilos, describiendo diversos métodos para el aislamiento de estos microorganismos, según su versatilidad de suplementos alimenticios y capacidad tolerante al agente solidificante. Entre estos métodos resalta un medio denominado Feo, el cual es un medio de doble capa que incluye una bacteria acidófila organótrofa. Los componentes en la primera capa (abajo) son: TSB como fuente de carbono, sulfato de amonio, sulfato de sodio, fosfato de potasio, agarosa y la se acidiona bacteria acidófila organotrófofa *Acidiphilium cryptum*, luego se adiciona la segunda capa (arriba) con los siguientes componentes: sulfato de hierro, sulfato de amonio, sulfato de magnesio y fosfato de potasio, agarosa. El principio del método es que la bacteria *A. cryptum* consumirá los ácidos carbónicos producidos durante la incubación, facilitando el crecimiento de los microbios acidófilos quimiolitótrofos (Johnson & Hallberg, 2007). En esta investigación se intentó realizar este procedimiento, empezando por el aislamiento de *Acidiphilium* spp, pero por la utilización de muestra de roca mineral, no se obtuvo los resultados esperados. *Acidiphilium* spp. es un componente crítico para la preparación de este medio de cultivo.

En nuestros resultados se obtuvo el aislamiento de microorganismos acidófilos (Figura 20), y dentro de ellos se evidenció por biología molecular la presencia de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en todas las muestras, debido a las condiciones explicadas líneas arriba. La presencia de *Leptospirillum ferrooxidans* en el consorcio aislado a partir de mineral de oro, se explica por la presencia de piritita en la composición de la muestra de oro, esto ayudó al crecimiento de este microbio en el medio y su adaptación a los componentes del medio líquido. Estos datos fueron verificados por secuenciamiento directo tipo SANGER con el marcador 16S rDNA, que es muy utilizado como marco de referencia para la clasificación taxonómica bacteriana y los primers fueron tomadas a partir del trabajo publicado por la Dra. Blanca Escobar (referente mundial de Biominería) del año 2008, en el cual ella realiza una estandarización de un protocolo de PCR para la detección específica de las especies *A. ferrooxidans* y *L. ferrooxidans* basados en el marcador de 16S rRNA a partir de muestras ambientales con una sensibilidad de 1 ng de ADN (Escobar *et al*, 2008).

Un carácter diferencial que indica el buen camino en el aislamiento de estos microorganismos es la oxidación de hierro, el hierro ferroso (Fe^{2+}) de color turquesa al momento de oxidarse cambia a hierro férrico (Fe^{3+}) de color rojo-naranja. La mayoría de especies habitantes en drenajes de ácidos de mina son bacterias oxidantes de hierro por lo que el agua es generalmente de color rojo-naranja. La velocidad de oxidación del hierro depende de cada organismo porque cada uno de acuerdo al taxón que pertenece, tienen enzimas específicas para la oxidación del hierro. Por ejemplo un estudio publicado por Bonnefoy & Holmes (2012) y Ilbert & Bonnefoy (2013), describió que *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans* oxidan de manera diferente el hierro. *A. ferrooxidans* utiliza Rusticianina y *L. ferrooxidans* utiliza citocromo 572 (cyt572). En este trabajo se encontró diferencias en la oxidación de hierro entre cultivos que solo se identificó *A. ferrooxidans* y *A. ferrooxidans* + *L. ferrooxidans*. La sinergia entre cultivos de *A. ferrooxidans* y *L. ferrooxidans* no ha sido evaluado porque ambos son bacterias oxidantes de hierro, los consorcios mejores evaluados han sido entre *L. ferrooxidans* (oxidante de hierro) y *A. thiooxidans* (oxidante de azufre). La principal razón por la cual se evidenció una mayor oxidación de hierro en el consorcio de oro es porque *L. ferrooxidans* tiene un menor potencial redox (ratio de la tasa de oxidación entre Fe(II) y Fe(III)), lo que le permite tener un rápido consumo de hierro, además de tener una afinidad por la pirita (Rawlings *et al*, 1999). Otras razones que pueden explicar las diferencias de oxidación de hierro entre diferentes consorcios es que se a realizado a partir de aislamientos parciales, pudiendo contener trazas de metales que pueden inhibir el crecimiento bacteriano Tungsteno (Negishi *et al*, 2005) y altas concentraciones de iones de hierro (III) inhiben el crecimiento de *A. ferrooxidans* (Kawabe *et al*, 2003).

VI. CONCLUSIONES

- a. Las bacterias oxidantes de hierro se pueden aislar a partir de rocas minerales con técnicas convencionales de microbiología e identificar con técnicas moleculares.
- b. Para el aislamiento de estas bacterias es muy importante el suministro de oxígeno, por lo que es necesario la agitación mediante el uso de shaker.
- c. Se confirma que la especie más frecuente en este tipo de ambientes es *Acidithiobacillus ferrooxidans*.
- d. Se reconfirma que *L. ferrooxidans* se halla por lo general en ambientes que contiene pirita.
- e. La sinergia entre especies *A. ferrooxidans* y *L. ferrooxidans* aumenta el proceso de biooxidación de hierro.

VII. RECOMENDACIONES

- Las bacterias acidófilas son muy sensibles a medios de soporte como agar o agarosa, por ello, se recomienda evaluar otros diferentes soportes que permitan el crecimiento óptimo de estos microorganismos.
- Se recomienda realizar estudios prospectivos para determinar cepas microbianas acidófilas de gran potencial biotecnológica, ello se puede realizar a través de estudios metagenómicos y bioinformáticos.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abanto M, Pariona N, Calderón J, Guerra G, Ramírez R, Delacruz-Calvo F y Ramírez P. (2013). Molecular identification of iron oxidizing bacteria isolated from acid mine drainages in Peru. *Advanced Materials Research*; 825, 84-87.
- Abanto M. (2008). Diversidad Molecular de bacterias oxidadoras de hierro aisladas de drenajes ácidos de minas del Perú. [Tesis de grado]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima.
- Abbaspour N, Hurrell R y Kelishadi R. (2014). Review on iron and its importance for human health. *J Res Med Sci*, 19(2), 164-74.
- Acevedo, F. (2003). The use of reactors in biomining processes. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2000; 3(3). ISSN: 0717-3458.
- Alegre, C. (2003). Selección de cepas de *Thiobacillus ferrooxidans* resistentes al arsénico y condiciones óptimas de cultivo para el biotratamiento de minerales concentrados de oro [Tesis de grado]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima.
- Ali N, Pontello R, Tavares A y Krieger M. (2017). Current Nucleic Acid Extraction Methods and their implications to Point-of-care diagnostics. *Biomed Res Int*. DOI: 10.1155/2017/9306564.
- Archibald F. (1983). *Lactobacillus plantarum*, an organism not requiring iron. *FEMS Microbiology*, 19, 29-32.
- Beard J. (2001). Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning. *J Nutr*, 131(2s-2), 568S-579S.
- Bonnefoy V y Holmes D. (2012). Genomic insights into microbial iron oxidation and iron uptake strategies in extremely acidic environments. *Environ Microbiol*, 14(7), 1597-611.
- Bosecker K. (1997). Bioleaching: metal solubilization by microorganisms. *FEMS Microbiology Reviews*, 20(3-4), 591-604.
- Brierley J y Brierley C. (2013) Progress in bioleaching: part B: applications of microbial processes by the minerals industries. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97(17), 7543-7552.
- Brierley C. (2008) How will biomining be applied in future?. *Transactions of nonferrous Metals Society of China*, 18, 1302-1310.
- Brune K y Bayer T. (2012). Engineering microbial consortia to enhance biomining and bioremediation. *Front Microbiol*, 3, 203.
- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10, 421.
- Chen B, Wen J y Yao G. (2014). Acidophiles and its use in mineral biomining with emphasis on China. *Adv. Materials Research*, 926, 4201-04.

- Chen L, Huang L, Méndez-García C, Kuang J, Hua Z, Liu J y Shu W. (2016). Microbial communities, processes and functions in acid mine drainage. *Current Opinion in Biotechnology*, 38, 150-158.
- Comer A y Hinkle M. (1947). The role of microorganisms in acid mine drainage: A preliminary report. *Science*, 106(2751), 253-6.
- Dabrowski J, Dabrowski J, Hill L, MacMillan P y Oberholster P. Fate (2014). Transport and Effects of pollutants originating from acid mine drainage in the olifants river, South Africa. *River Research and Applications* [Internet]. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rra.2833/abstract>
- Dammert A. & Molinelli F. (2007). Panorama de la Minería en el Perú. Perú. *Organismo Supervisor de la Inversión en Energía y Minería*; Lima, Perú.
- Demergasso C, Galleguillos P, Escudero L, Zepeda V, Castillo D y Casamayor E. (2005). Molecular characterization of microbial populations in a low-grade copper ore bioleaching test heap. *Hydrometallurgy*, 80, 241-253.
- Ding J, Zhang R, Yu Y, Jin D, Liang C, Yi Y, Zhu W y Xia J. (2011). A novel acidophilic, thermophilic iron and sulfur-oxidizing archaeon isolated from a hot spring of tengchong, Yunnan, China. *Braz J Microbiol*, 42(2), 514-525.
- Dold B. (2014). Evolution of Acid Mine Drainage Formation in Sulphidic Mine Tailings. *Minerals*, 4, 621-641.
- Dopson M, Baker-Austin C, Koppineedi P y Bond P. (2003). Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic microorganisms. *Microbiology*, 149, 1959-70.
- Elías X. (2012). Los Residuos Mineros. En: Elías X, editor. *Reciclaje de Residuos industriales: Residuos sólidos urbanos y fangos de depuradora*. 2º Edición, días de Santos, España, 664 – 695.
- Emerson D, Fleming E y McBeth J. (2010). Iron-oxidizing bacteria: an environmental and genomic perspective. *Annu Rev Microbiol*, 64, 561-83.
- Escobar B, Bustos K, Morales G y Salazar O. (2008). Rapid and specific detection of *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans* by PCR. *Hydrometallurgy*, 92(3-4), 102-6.
- García O, Tuovinen O y Bigham J. (1995). Oxidation of galena by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*. *Canadian Journal of Microbiology*, 41(6), 508-514.
- Garibyan L y Avashia N. (2013). Research techniques made simple: Polymerase chain reaction (PCR). *J Invest Dermatol*, 133(3), e6.
- Gonzalez-Toril, E; Gómez F, Rodríguez N, Fernández-Remolar D, Zuluaga J, Marín I y Amils R. (2003b) Geomicrobiology of the Tinto River, a model of interest for biohydrometallurgy. *Hydrometallurgy*, 71(1), 301-309.

- Gonzalez-Toril, E; Llobet-Brossa, E; Casamayor, E; Amann R y Amils R. (2003a). Microbial ecology of an extreme acidic environment, the Tinto River. *Appl Environ Microbiol*, 69(8), 4853 – 4865.
- Gumulya Y, Boxall N, Khaleque H, Santala V, Carlson R y Kaksonen A. (2018). In a quest for engineering acidophiles for biomining applications: Challenges and opportunities. *Genes*, 9, 116.
- Gutierrez, S. (1998). Estudio de la microflora heterótrofa acompañante de *Thiobacillus ferrooxidans* en ambientes de Lixiviación de cobre [Tesis de maestría]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima.
- Habashi F. (2011). Pollution problems in the metallurgy industry: A review. *Journal of Mining & Environment*, 2, 17-6.
- Hallberg K & Johnson B. (2007). Isolation, Enumeration, Growth and Preservation of Acidophilic prokaryotes. En: Hurst C, Crawford R, Garland J, Lipson D, Mills A & Stetzenbach L, editores. *Manual of Environmental Microbiology*. 3a Edición. USA. ASM Press, 1155-1165.
- Hallberg K y Johnson B. (2003). Novel acidophiles isolated from moderately acidic mine drainage waters. *Hydrometallurgy*, 71, 139-148.
- Hallberg K, González-Toril E y Johnson B. (2010). *Acidithiobacillus ferrivorans*, sp. nov.: facultatively, psychrotolerant iron-, and sulfur-oxidizing acidophiles isolated from metal mine-impacted environments. *Extremophiles*, 14(1), 9-19.
- Hao C, Zhang H, Haas R, Bai Z y Zhang B. (2007). A novel community of acidophiles in an acid mine drainage sediment. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(1), 15-21.
- Hedrich S, Schlöman y Johnson B. (2011). The iron-oxidizing Proteobacteria. *Microbiology*, 157, 1551-1564.
- Ijaz K, Iqbal J Zeshan B, Majeed T, Riaz T, Khalid S, Biag S y Saleem M. (2017). Potential impact of microbial consortia in biomining and bioleaching of commercial metals. *Adv. Life Sci*, 5(1), 13-18.
- Ilbert M y Bonnefoy V. (2013). Insight into the evolution of the iron oxidation pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Bioenergetics*, 1827(2), 161-175.
- Ishmael F y Stellato C. (2008). Principles and applications of polymers chain reaction: basic science for the practicing physician. *Ann Allergy Asthma Immunol*, 101(4), 437-43.
- Jahani S, Fatemi F, Firoz-e-zare M y Zolfaghari M. Isolation and Characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain FJS from Ramsar, Iran. *Electronic Journal of Biology*, 11(4), 138-146.
- Jaramillo M, Abanto M, Quispe R, Calderon J, DelValle L, Talledo M & Ramirez P. (2012) Cloning, expression and bioinformatics analysis of ATP sulfurylase

- from *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 in *Escherichia coli*. *Bioinformation*, 8(15), 695-704.
- Jaramillo, M. (2008). Caracterización molecular de la ATPasa sulfurilasa de *Acidithiobacillus ferrooxidans* [Tesis magister]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima.
- Johnson B y Hallberg K. (2007). Techniques for detecting and identifying acidophilic mineral-oxidizing microorganisms. En: Johnson B & Rawlings D, editores. *Bio-mining*. 1a Edición. Alemania. Springer, 237-257.
- Johnson B y Schippers A. (2017). Recent advances in acidophile microbiology: Fundamentals and Applications. *Frontiers in Microbiology*, 428.
- Johnson B, Kanao T y Hedrich S. (2012). Redox transformations of iron at extremely low pH: Fundamental and Applied Aspects. *Front Microbiol*, 3, 96.
- Johnson B, Macvicar J y Rolfe S. (1987). A new solid medium for the isolation and enumeration of *Thiobacillus ferrooxidans* and acidophilic heterotrophic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 7(1), 9-18.
- Johnson B. (1998). Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *FEMS Microbiology Ecology*, 27(4), 307-317.
- Johnson B. (2008). Biodiversity and interactions of acidophiles: Key to understanding and optimizing microbial processing of ores and concentrates. *Trans. Nonferrous Met. Soc. China*, 18, 1367-1373.
- Johnson B. (1995). Selective solid media for isolating and enumerating acidophilic bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 23, 205-218.
- Kaksonen A, Mudunuru B y Hack R. (2014). The role of microorganisms in gold processing and recovery – A review. *Hydrometallurgy*, 142, 70-83.
- Kawabe Y, Inoue C, Suto K y Chida T. (2003). Inhibitory effect of high concentrations of ferric ions on the activity of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *J Biosci Bioeng*, 96(4), 375-9.
- Kelly D y Wood A. (2000). Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov. *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 511-516.
- Kim S, Bae J, Park H y Cha D. (2005). Bioleaching of cadmium and nickel from synthetic sediments by *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Environ Geochem Health*, 27(3), 229-235.
- Klausner R y Rouault T. (1996). The molecular basis of iron metabolism. *Harvey Lect*, 92, 99-112.
- Kundu K y Kumar A. (2014) Biochemical engineering parameters for hydrometallurgy processes: steps towards a deeper understanding. *Journal of Mining*. doi 10.1155/2014/290275.

- Laznicka P. (2010) Giant Metallic Deposits: Future Sources of industrial metals. 2° Ed. Estados Unidos: Springerlink.
- Liu Jan-she, Xie Xue-hui, Xiao Sheng-mu, Wang Xiu-mei, Zhao Wen-jie y Tian Zhuo-li. (2007). Isolation of *Leptospirillum ferriphilum* by single-layered solid medium. *Journal of Central South University of Technology*, 14(4), 467-473
- Liu Y, Yang H, Zhang X, Xiao Y, Guo X y Liu X. (2016). Genomic analysis unravels reduced inorganic sulfur compound oxidation of heterotrophic acidophilic *acidicaldus* sp strain Dx-1. *Boimed Res Int*. DOI: 10.1155/2016/8137012.
- Ly M y Niekerk J. (2006). Biooxidation of arsenopyrite concentrate using BIOX® process: Industrial experience in Tamboraque, Perú. *Hydrometallurgy Journal*, 83(1), 90-96.
- Lynn N. (1997). The bioleaching and processing of refractory gold ore. *JOM*, 49(4), 24-26.
- MACROCONSULT. (2011). Impacto Económico de la Minería en el Perú. Perú. Sociedad Nacional de Minería, Petróleo y Energía. Lima.
- New médium for isolating iron-oxidizing and heterotrophic acidophilic bacteria from acide mine drainage. 1975; 30(6): 1010-6.
- Mapaure I, Chimwamurobe P, Mapani B y Kamona F. (2011). Impacts of mine dump pollution on plant species diversity, composition and structure of a semiarid savanna in Namibia. *African Journal of Range & Forage Science*, 28(3), 149-154.
- Maturrano, A. (1996). Participación de Microorganismos heterótrofos en procesos de lixiviación bacteriana [Tesis de magister]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima.
- Meruane G y Vargas T. (2003) Bacterial oxidation of ferrous iron by *Acidithiobacillus ferrooxidans* in the pH range 2.5 – 7.0. *Hydrometallurgy*, 71(1),149 -158
- Ministerio de Energía y Minas. Dirección General de Minería. (2014) Anuario Minero 2014: Reporte estadístico. Lima: Ministerio de Energía y Minas. Dirección General de Minería. Lima
- Ministerio de Energía y Minas. Dirección General de Minería. (2012). Boletín Mensual de Minería. Lima: Ministerio de Energía y Minas. Dirección General de Minería, Lima.
- Ministerio de Energía y Minas. Dirección General de Minería. (2016). Anuario Minero 2016: Reporte estadístico. Lima: Ministerio de Energía y Minas. Dirección General de Minería.
- Mishra A, Roy P y Mahapatra R. (1983). Isolation of *Thiobacillus ferrooxidans* from various habitats and their growth pattern on solid medium. *Current microbiology*, 8, 147-152.

- Mishra D, Kim D, Ahn J y Rhee Y. (2005). Bioleaching: A microbial process of metal recovery; a review. *Metals and materials International*, 11(3), 249-256.
- Morgan B y Lahav O. (2007). The effect of pH on the kinetics of spontaneous Fe(II) oxidation by O₂ in aqueous solution - basic principles and a simple heuristic description. *Chemosphere*, 68, 2080-84.
- Niemelä S, Sivelä C, Luoma T y Tuovinen O. (1994). Maximum temperature limits for acidophilic, mesophilic bacteria in biological leaching systems. *Appl Environ Microbiol*, 60(9), 3444-46.
- Ñancucheo I y Johnson B. (2012). Acidophilic algae isolated from mine-impacted environments and their roles in sustaining heterotrophic acidophiles. *Front Microbiol*, 3, 325.
- Negishi A, Muraoka T, Maeda T, Takeuchi F, Kanao T, Kamimura K, y Sugio T. (2005). Growth inhibition by tungsten in the sulfur-oxidizing bacterium *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 69(11), 2073-80.
- Nguyen T, Nguyen T, Duong T, Le T y Ho C. (2014). Physiological properties of new species of *Acidithiobacillus* isolated from abandoned Tin mine in Ha Thuong, Thai Nguyen province. *J Viet Env*, 6(3): 196-200.
- Nwoye C, Asuke F, Ejimofor R y Onyemaobi O. (2013). Biooxidation of galena by *Acidithiobacillus thiooxidans* (ATT) and Prediction of Maximum Lead Extraction based on optimized leaching time. *International Science and Investigation Journal*, 2(5).
- Olson G, Brierley J y Brierley C. (2003). Bioleaching review part B: Progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries. *Appl Microbiol Biotechnol*, 63, 249-257.
- Pikuta E y Hoover R. (2007). Microbial extremophiles at the limits of life. *Critical Reviews in Microbiology*, 33, 183-209.
- Pradhan N, Nathsarma K, Srinivasa K, Sukla L y Mishra B. (2008). Heap bioleaching of chalcopyrite: A review. *Minerals Engineering*, 21, 355-365.
- Ramirez P, Toledo H, Guilianini N y Jerez C. (2002). An exported rhodanese-like protein is induced during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in metal sulfides and different sulfur compounds. *Appl Environ Microbiol*, 68(4), 1837-1845.
- Rawlings D y Johnson B. (2007). The microbiology of biomining: development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia. *Microbiology*, 153, 315-324.
- Rawlings D & Johnson D. (2002). Ecology and biodiversity of extremely acidophilic microorganisms. Webpublication/site, EOLSS Publishers.
- Rawlings D, Dew D y Plessis C. (2003). Biomineralization of metal-containing ores and concentrates. *Trends in Biotechnology*, 21(1), 38.

- Rawlings D. (2007). Relevance of cell physiology and genetic adaptability of biomining microorganisms to industrial processes. En: Rawlings & Johnson (editors). Biomining. 1a edición. Alemania. Springer. p. 177-195.
- Rawlings D, Tributsch H y Hansford G. (1999). Reasons why 'Leptospirillum'-like species rather than Thiobacillus ferrooxidans are the dominant iron-oxidizing bacteria in many commercial processes for the biooxidation of pyrite and related ores. *Microbiology*, 145(Pt 1)(1), 5-13.
- Risikat A, Baba A, Al-Hasan S, Folake A y Abiodun A. (2012). Bioleaching of Lead from Nigerian Anglesite ore by Acidithiobacillus ferrooxidans. *Journal of Applied Sciences Research*, 8(12), 5591-5598.
- Romo E, Weinacker D, Zepeda A, Figueroa C, Chavez P y Farias J. (2013). Bacterial consortium for copper extraction from sulphide ore consisting mainly of chalcopyrite. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(2), 523-528
- Saavedra A. (2009). Solubilización de sulfuros de Zinc a partir del mineral esfalerita del Yacimiento minero "María Grimanesa" por lixiviación microbiana con cepas nativas [Tesis]. Universidad Nacional Jorge Basadre Groverman. Tacna
- Saitou N y Nei M. (1987). The Neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 4(4), 406-25.
- Sanchez-Andrea I, Rodríguez N, Amils R y Sanz J. (2011). Microbial diversity in Anaerobic sediments at Río Tinto, a naturally acidic environment with a high heavy metal content. *Appl Environ Microbiol*, 77(17), 6085-6093.
- Sánchez-Andrea I, Stams A, Amils R y Sanz J. (2013). Enrichment and isolation of acidophilic sulfate-reducing bacteria from Tinto River sediments. *Environmental Microbiology Reports*, 5(5), 672-8
- Sand W, Gehrke T, Jozsa P y Schippers A. (2003). (Bio)chemistry of bacterial leaching- direct vs. indirect leaching. *Hydrometallurgy*, 59(2-3), 159-175.
- Schippers A, Hedrich S, Vasters J, Drobe M, Sand W y Wilscher S. (2013). Biomining: metal recovery from ores with microorganisms. *Adv. Biochem Eng Biotechnol*, 141, 1-47.
- Schippers A.(2007). Microorganisms involved in bioleaching and nucleic acid- based molecular methods for their identification and quantification. En: Donati E & Sand W, editores. Microbial Processing of Metal Sulfides. 1a Edición. Holanda. Springer,. 3-34.
- Schrader J y Holmes D. (1988). Phenotypic switching of Thiobacillus ferrooxidans. *Journal of Bacteriology*, 170, 3915-3.
- Shendure J, Balasubramanian S, Church G, Roger J, Schloss J y Waterson R. (2017). DNA sequencing at 40: past, present and future. *Nature*, 550, 345-353.
- Shiers D, Collison D y Watling H. (2016). Life in heaps: A review of microbial responses to variable acidity in sulfide mineral bioleaching heaps for metal extraction. *Research in Microbiology*, 167(7), 576-586

- Silverman M y Lundgren D. (1959). Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*. I. An improved medium and a harvesting procedure for securing high cell yields. *J Bacteriol*, 77(5), 642-647.
- Sociedad Nacional de Minería, Petróleo y Energía. (2011). Reservas Mineras. Informe Quincenal de la SNMPE. Lima.
- Sugio T, Wakabayashi M, Kanao T y Takeuchi F. (2008). Isolation and characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* strain D3-2 active in copper bioleaching from a copper mine in Chile. *Biosci Biotechnol Biochem*, 72, 998-1004.
- Tan S y Chin B. (2009). DNA, RNA and Protein Extraction; The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*; DOI: 10.1155/2009/574398.
- Tanaka M, Yamaji Y, Fkano Y, Shimada K, Ishibashi J, Hirajima T, Sasaki K, Sawada M y Okibe N. (2015) Biooxidation of gold-, silver, and antimony-bearing highly refractory polymetallic sulfide concentrates, and its comparison with abiotic pretreatment techniques. *Geomicrobiology Journal*, 32(6), 538-548.
- Tao H y Dongwei L. (2014). Presentation on mechanisms and applications of chalcopyrite bioleaching in biohydrometallurgy – a presentation. *Biotechnology Reports*, 4, 107-119.
- Temple K y Colmer A. (1951). The autotrophic oxidation of iron by a new bacterium: *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of Bacteriology*, 62(5), 605-611.
- Tuovinen O y Kelly D. (1973). Studies on the growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. I. Use of membrane filters and ferrous iron agar to determine viable numbers, and comparison with ¹⁴CO₂-fixation and iron oxidation as measures of growth. *Arch. Mikro boil*, 88, 285-298.
- Vera M, Rohwerder T, Bellenberg S, Sand W, Denis Y y Bonnefoy V. (2009). Characterization of Biofilm formation by the bioleaching acidophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* by microarray. *Biohydrometallurgy*, 71-73, 175-178.
- Vera M, Schippers A y Sand W. (2013). Progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation-partA. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(17), 7529-41.
- Waksman S y Joffe J. (1992). Microorganisms concerned in the oxidation of sulfur in the soil. II. *Thiobacillus thiooxidans*, a new sulfur-oxidizing organism isolated from the soil. *J Bacteriol*, 7, 239-56.
- Wang Y, Zeng W, Qiu G, Chen X y Hongbo Z. (2014). A moderately thermophilic mixed microbial culture for bioleaching of chalcopyrite concentrate at high pulp density. *Appl Environ Microbiol*, 80(2), 741-750.
- Watling H. (2006). The bioleaching of sulphide minerals with emphasis on copper sulphides. A review. *Hydrometallurgy*, 84(1-2), 81-108.

- Williams K, Gillespie J, Sobral B, Nordberg E, Snyder E, Shallom J y Dickerman A. (2010). Phylogeny of gammaproteobacteria. *J Bacteriol*, 192, 2305-14.
- Xia L, Yin C, Dai S, Qiu G, Chen X y Liu J. (2009). Bioleaching of chalcopyrite concentrate using *Leptospirillum ferriphilum*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Acidithiobacillus thiooxidans* in a continuous bubble column reactor. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 37(3), 289-95.
- Zeng L, Huang J, Zhang Y, Qiu G, Tong J, Chen D, Zhou J y Luo X.(2008). An effective method of DNA extraction for bioleaching bacteria from acid mine drainage. *Appl Microbiol Biotechnol*, 79(5), 881-8.
- Zhang L, Qiu G, Hu Y, Sun X, Li J y Gu G. (2008). Bioleaching of pyrite by *A. ferrooxidans* and *L. ferriphilum*. *Transactions of nonferrous Metals Society of China*, 18(6), 1415-20.
- Zhou H, Zhang R, Hu P, Zeng W, Xie Y, Wu C y Qiu G. (2008). Isolation and characterization of *Ferroplasma thermophilum* sp. nov., a novel extremely acidophilic, moderately thermophilic archaeon and its role in bioleaching of chalcopyrite. *Journal of Applied Microbiology*, 105(2), 591-601.

IX. IX. ANEXOS



Figura 1A. Minera artesanal. A. Camino hacia la minera artesanal, el camino vial es accidentado. B. Primer campamento de la minera artesanal.



Figura 2A. Entrada a la minera artesanal. Segundo campamento, a 10 metros de la entrada a los socavones.



Figura 3A. Colecta de muestra. Arriba. Socavón de entrada a una minera artesanal. Abajo. Toma de muestra mineral en frasco estéril.



Figura 4A. Campamento minero de la Unidad Huarón de la empresa Minera PanAmerican Silver.



Figura 5A. Instalaciones de la Planta de Beneficio de la minera ecuatoriana EXPAUSA.

Tabla 1A. Datos de crecimiento microbiano durante las pruebas de oxidación de hierro.

HORAS	Ag	Au	Cu
0	1.63E+05	1.76E+05	1.55E+05
0	1.71E+05	1.98E+05	1.43E+05
0	1.67E+05	1.86E+05	1.46E+05
12	2.95E+05	4.93E+05	4.00E+05
12	2.86E+05	4.86E+05	4.40E+04
12	2.85E+05	4.87E+05	4.49E+05
24	8.23E+05	1.02E+06	6.00E+05
24	8.00E+04	1.03E+06	5.99E+05
24	8.05E+05	1.02E+06	6.09E+05
36	4.57E+06	8.35E+06	5.10E+06
36	4.64E+06	8.40E+06	5.05E+06
36	4.66E+06	8.40E+06	5.07E+06
48	9.06E+06	1.06E+06	1.35E+06
48	9.14E+06	1.08E+06	1.37E+07
48	9.07E+06	1.04E+07	1.34E+07
60	9.70E+06	1.15E+07	1.36E+07
60	9.69E+06	1.15E+07	1.37E+07
60	9.69E+06	1.16E+07	1.37E+07
72	1.01E+07	1.24E+07	1.49E+07
72	1.00E+07	1.23E+07	1.49E+07
72	1.00E+07	1.23E+07	1.49E+07

Tabla 2A. Datos de bio-oxidación de hierro ferroso durante las pruebas de oxidación.

Peso Molecular			Concentración			
K2CrO7	294.185		K2CrO7	4.40%		
Fe	55.845		pureza K2CrO7	99.50%		
FeSO4	151.908		K2CrO7 cantidad real	4.37800%		
FeSO4.7H2O	278.05					
FeSO4.7H2O (g)	33.3					
	Dicromato de potasio		Sulfato ferroso	ion Ferroso (Fe2+)		
	gasto (en mL)	gasto (en mmol)	gasto (en mmol)	gasto (en mmol)	gasto (en g)	gasto (en g/L)
	BLANCO					
	5.7	0.853	5.115	1.880	105.014	7.001
	5.6	0.838	5.025	1.847	103.171	6.878
	5.6	0.838	5.025	1.847	103.171	6.878
	5.4	0.808	4.846	1.781	99.487	6.632
	5.3	0.793	4.756	1.748	97.644	6.510
	5.3	0.793	4.756	1.748	97.644	6.510
	5.5	0.823	4.936	1.814	101.329	6.755
	Ag					
	5.4	0.808	4.846	1.781	99.487	6.632
	4.3	0.643	3.859	1.419	79.221	5.281
	3.9	0.583	3.500	1.287	71.852	4.790
	2.6	0.389	2.333	0.858	47.901	3.193
	1.7	0.254	1.526	0.561	31.320	2.088
	0.9	0.135	0.808	0.297	16.581	1.105
	0.2	0.030	0.179	0.066	3.685	0.246
	Au					
	5.5	0.823	4.936	1.814	101.329	6.755
	3.5	0.523	3.141	1.155	64.482	4.299
	1	0.150	0.897	0.330	18.423	1.228
	0.5	0.075	0.449	0.165	9.212	0.614
	0.2	0.030	0.179	0.066	3.685	0.246
	0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	Cu					
	5.3	0.793	4.756	1.748	97.644	6.510
	5.1	0.763	4.577	1.683	93.960	6.264
	4.3	0.643	3.859	1.419	79.221	5.281
	3.2	0.479	2.872	1.056	58.955	3.930
	1.9	0.284	1.705	0.627	35.005	2.334
	1	0.150	0.897	0.330	18.423	1.228
	0.2	0.030	0.179	0.066	3.685	0.246