

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE MICROORGANISMOS BIOOXIDANTES DE ARSENOPIRITA

Quintana M.⁽⁵⁾; Ly M.^{(2), (3)}; Bauer J.⁽²⁾; Montoya Y.⁽¹⁾; Comallonga L.^{(2), (4)}; Vassel B.^{(2), (4)}; Espinoza M.⁽¹⁾; Espinoza J.^{(1), (5)}

(1) Departamento de Biología – IPEN / Lima, Perú

(2) Departamento de Microbiología – Universidad Particular Cayetano Heredia / Lima, Perú

(3) Compañía Minera Fortuna S.A.

(4) Escuela de Minas de Ales / Francia.

(5) Unidad de Biotecnología Molecular – Universidad Particular Cayetano Heredia / Lima, Perú

1. RESUMEN

La identificación de los genes de respuesta a condiciones extremas como altas temperaturas, alta concentración de metales de arsénico, pH muy bajo permitiría el establecimiento de procesos mas rápidos y eficientes de tratamiento de minerales mediante biominería. En este proceso los sulfuros metálicos insolubles son oxidados a sulfatos metálicos solubles (Rawlings & Silver, 1995). En el presente informe se presentan los avances en el aislamiento y caracterización de las poblaciones de microorganismos acidófilos y quimilitotróficos biooxidantes de hierro y sulfuros actuantes en la biooxidación de arsenopirita. Se han aislado microorganismos del género *Acidithiobacillus* y *Leptospirillum* en cultivos de 10⁵ ufc/ml en placa (proporción 1.5:1) identificados por morfología en coloración Gram y visualizados en el microscopio óptico (1000X).

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Cultivo y aislamiento de las bacterias.

Medio 271: APH

2.00 g de Sulfato de amonio, 0.50g de Fosfato de potasio dibásico, 0.50g de Sulfato de magnesio, 0.10g de Cloruro de potasio, 0.01g de Nitrato de calcio, 8.00g de Sulfato de hierro en 1 litro de agua destilada ajustada a pH 2 con ácido sulfúrico. Se esterilizó por filtración.

Medio sólido

A: Agarosa

Para eliminar sustancias orgánicas que puedan inhibir el crecimiento bacteriano, pues se trata de bacterias quimilitotróficas obligadas (Johnson, 2001), se lavó previamente la agarosa de la siguiente manera: 10 g de agarosa en 25ml de alcohol y 50 ml de agua destilada se

mantuvieron en agitación por 5 minutos luego del cual se dejó decantar la solución. Se descartó el sobrenadante (fase alcohólica) y se repitió el lavado con alcohol 2 veces más y luego sólo con agua destilada hasta eliminar cualquier resto de alcohol. Se completó a 50 ml de agua destilada y se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 min.

B: Medio Holmes 10X

35 ml de medio 9K 10X, 7.5 ml de solución de sulfato ferroso heptahidrato a pH 2 y 407.5ml agua destilada ácida (pH 3). Medio 9K 10: 30.00 g de Sulfato de amonio, 0.50g de Fosfato de potasio dibásico, 5.0g de Sulfato de magnesio, 1.0g de Cloruro de potasio, 0.12g de Nitrato de calcio, 10 ml de ácido sulfúrico en 1 600 ml de agua destilada. Se esterilizó en autoclave a 121°C x 15 min. Solución de sulfato ferroso: 5g de sulfato ferroso en 15 ml de agua destilada. Se ajustó el pH a 2 con ácido sulfúrico y se esterilizó por filtración. Se mezclaron B y A a 55°C aprox. El medio fue distribuido en placas, las cuales fueron incubadas a 37°C por 24 horas.

2.2 Procedimiento

- Se colectó una muestra del tanque 3 de la mina Tamboraque (Huarochirí, Lima), se observó una gota de la muestra en el microscopio de contraste de fases y se verificó la presencia de microorganismos.
- Para aumentar la población de bacterias oxidantes de hierro y/o sulfatos y adaptar a dichos microorganismos a condiciones de laboratorio se sembró 10 ml de dicha muestra en 100 ml de medio 271 APH (2 repeticiones) y se dejó en incubación a 37°C hasta ver cambiar el medio a un color naranja intenso por efecto de la oxidación bacteriana del sulfato ferroso presente en el medio a sulfato férrico (Rawlings y col, 1999) (6 días aprox.).

- Para verificar la presencia bacteriana en el medio oxidado se cogió una gota del cultivo y se realizó coloración Gram, observándose en el microscopio la presencia de bacterias oxidantes de hierro y/o sulfato (Gram negativas)
- De este cultivo se cogió 1 ml y se sembró en 100 ml de medio APH fresco. Se dejó en incubación a 37°C, esta vez por 8 días aprox.
- Con el fin de obtener cultivos puros, se sembró con ayuda de un asa de vidrio, 10 µl del cultivo mixto en las placas con medio sólido tratado especialmente para estas bacterias y así conseguir colonias separadas que permitan el aislamiento y futura identificación de los microorganismos presentes en la muestra. Las placas se dejaron en incubación a 37°C hasta la aparición de las colonias (14 días aprox.).

3. RESULTADOS

3.1 Colección muestras

Se tomó una muestra de 1L del tanque 3 del proceso a escala de laboratorio de la mina Tamboraque. De la muestra se inoculó 10 ml en 100 ml de los medios sintéticos 882 y el APH (pH2) por duplicado. Los cultivos se incubaron a 37°C sin agitación. Luego de 6 días se hizo el monitoreo del cambio de coloración en el medio por la oxidación del ión ferroso a ión férrico, observándose crecimiento en el medio APH y no crecimiento en 882. (Fig. 1).

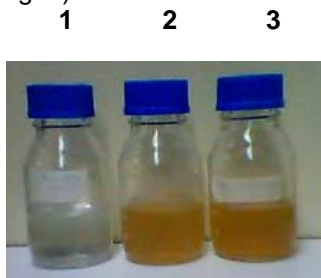


Figura 1. Cultivo de microorganismos biooxidantes en medio APH. **1.** Control; **2.** Cultivo primario; **3.** Cultivo secundario. **N.B.** la coloración debida a la oxidación de ión ferroso a ión férrico.

3.2 Coloración Gram

Los microorganismos acidófilos y quimilitotróficos oxidantes de hierro y/o sulfatos que crecieron en el cultivo primario con medio APH fueron teñidos con la coloración Gram, observándose solo bacilos Gram negativos con morfología correspondiente a *Acidithiobacillus* y *Leptospirillum* (Johnson, 2001) en una proporción de 1.5:1.

3.3 Aislamiento en placa

El cultivo primario fue pasado a medio fresco APH observándose un crecimiento adecuado. Una alícuota de este medio se sembró en un medio sólido para el aislamiento de especies de microorganismos acidófilos y quimilitotróficos biooxidantes de manera que nos permita separar e identificar clones de estos organismos para su caracterización genética.

3.4 Genotipificación de microorganismos biooxidantes.

Se han diseñado primers para identificar molecularmente las especies de bacterias biooxidantes de la muestra, sobre la base de la información de secuencias depositadas en el GenBank del gen 16S rRNA de *Acidithiobacillus* (GenBank Accesion N° AB039820) y *Leptospirillum* (GenBank Accesion N° AF356838). Para tal fin se hicieron alineamientos múltiples que nos permitieran identificar las regiones conservadas del 16S rRNA entre estas especies pero a su vez, diferentes para el resto de acidobacterias (Figura 2). Los primers fueron diseñados a partir de dichas regiones conservadas utilizando el programa Oligo version 2. La genotipificación se efectuará por análisis de restricción usando la enzima *StuI* (Figura 3).

4. REFERENCIAS

- 1). Johnson, D. (2001) Genus II *Leptospirillum* Hippe 2000 (ex Markosyan 1972, 26) pp. 453-457. En G. Garrity (ed.) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd ed., vol I. Springer- Verlag, Berlin, Germany.
- 2). Rawlings D.E., Tributsch H. & Hansford G.S. (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**: 5-13.

- 3). Rawlings, D. and Silver, S. (1995) Mining with microbes. *Bio/Technology* **13**:773-778.

gi	871397		---	*	20	*	40	*	60	*	80	
gi	1844820	:	GTCTGACAGAG-TTTTGTATCGTGGCTCAGAA	CGAA	CGTGGCGGCGTGCCTAA	CACATGCAAGTCCGACGTGAAAAGGGGAG-	:	52				
gi	1844820	:	GTCTGACAGAG-TTTTGTATCGTGGCTCAGAA	CGAA	CGTGGCGGCGTGCCTAA	CACATGCAAGTCCAA	CGTAAAAGGGGAG-	:	78			
gi	1844820	:	GTCTGACAGAG-TTTTGTATCGTGGCTCAGAA	CGAA	CGTGGCGGCGTGCCTAA	CACATGCAAGTCCAA	CGTAAAAGGGGAG-	:	78			
gi	1844820	:	GTCTGACAGAG-TTTTGTATCGTGGCTCAGAA	CGAA	CGTGGCGGCGTGCCTAA	CACATGCAAGTCCAA	CGTAAAAGGGGAG-	:	79			
gi	1844820	:	GTCTGACAGAG-TTTTGTATCGTGGCTCAGAA	CGAA	CGTGGCGGCGTGCCTAA	CACATGCAAGTCCAA	CGTAAAAGGGGAG-	:	78			
gi	1844819	:	GTCTGACAGAG-TTTTGTATCGTGGCTCAGAA	CGAA	CGTGGCGGCGTGCCTAA	CACATGCAAGTCCAA	CGTAAAAGGGGAG-	:	79			
gi	1424889	:	-----	AA	CGAA	CGTGGCGGCGTGCCTAA	CACATGCAAGTCCAA	CGTAAAAGGGGAG-	:	52		
gi	1844819	:	GTCTGACAGAG-TTTTGTATCGTGGCTCAGAA	CGAA	CGTGGCGGCGTGCCTAA	CACATGCAAGTCCAA	CGTAAAAGGGGAG-	:	78			
gi	1844819	:	GTCTGACAGAG-TTTTGTATC-TGGCTCAGAA	CGAA	CGTGGCGGCGTGCCTAA	CACATGCAAGTCCAA	CGTAAAAGGGGAG-	:	77			
gi	6491778	:	-----	AA	CGAA	CGTGGCGGCGTGCCTAA	CACATGCAAGTCCAA	CGTAAAAGGGGAG-	:	52		
gi	1844819	:	GTCTGACAGAG-TTTTGTATCGTGGCTCAGAA	CGAA	CGTGGCGGCGTGCCTAA	CACATGCAAGTCCAA	CGTAAAAGGGGAG-	:	78			
gi	1844819	:	-----	TGGCTCAGAA	CGAA	CGTGGCGGCGTGCCTAA	CACATGCAAGTCCAA	CGTAAAAGGGGAG-	:	60		
gi	2135978	:	-----	AGATTGAA	CGTGGCGGCGTGCCTAA	CACATGCAAGTCCAA	CGTAAAAGGGGAG-	:	55			
gi	7228414	:	-----	-----	AAGGCGG	CGATGCCTAA	CACATGCAAGTCCAA	CGTAAAAGGGGAG-	:	44		
gi	1143606	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-		
						aacgaacgctggcggcgctgcctaacacacatgcaagtc	acgtgaaaggggagg					
gi	871397		-G	*	1540	*	1560					
gi	1844820	:	-GAAAGTCGTAA	CAAGGTAA	-CCGCGT	TAGA	-----	:	1484			
gi	1844820	:	-GAAAGTCGTAA	CAAGGTAC	-CCGTCT	TAGA	-----	:	1537			
gi	1844820	:	-GAAAGTCGTAA	CAAGGTAC	-CCGTCT	TAGA	-----	:	1537			
gi	1844820	:	-GAAAGTCGTAA	CAAGGTAC	-CCGTCT	TAGA	-----	:	1536			
gi	1844820	:	-GAAAGTCGTAA	CAAGGTAC	-CCGTCT	TAGA	-----	:	1535			
gi	1844819	:	-GAAAGTCGTAA	CAAGGTAC	-CCGTCT	TAGA	-----	:	1538			
gi	1424889	:	-G	-----	-----	-----	-----	:	1484			
gi	1844819	:	-GAAAGTCGTAA	CAGG	-AC	-CCGTCT	TAGA	-----	:	1531		
gi	1844819	:	-GAAAGTCGTAA	CAAGGTAC	-CCGTCT	TAGA	-----	:	1534			
gi	6491778	:	-----	-----	-----	-----	-----	:	-			
gi	1844819	:	-GAAAGTCGTAA	CAAGGTAC	CCCCGT	CTAGA	-----	:	1535			
gi	1844819	:	-GAAAGTCGTAA	CAAGGTAC	-CCGTCT	TAGA	-----	:	1516			
gi	2135978	:	-G	-----	-----	-----	-----	:	1462			
gi	7228414	:	TGAAAGTCGTAA	CAAGGTAA	-CCGTAG	GGGAA	CCTGCGGTT	-----	:	1490		
gi	1143606	:	-----	-----	-----	-----	-----	:	-			

Figura 2. Alineamiento múltiple de secuencias del 16S rRNA de Acidithiobacillus y Leptospirillum

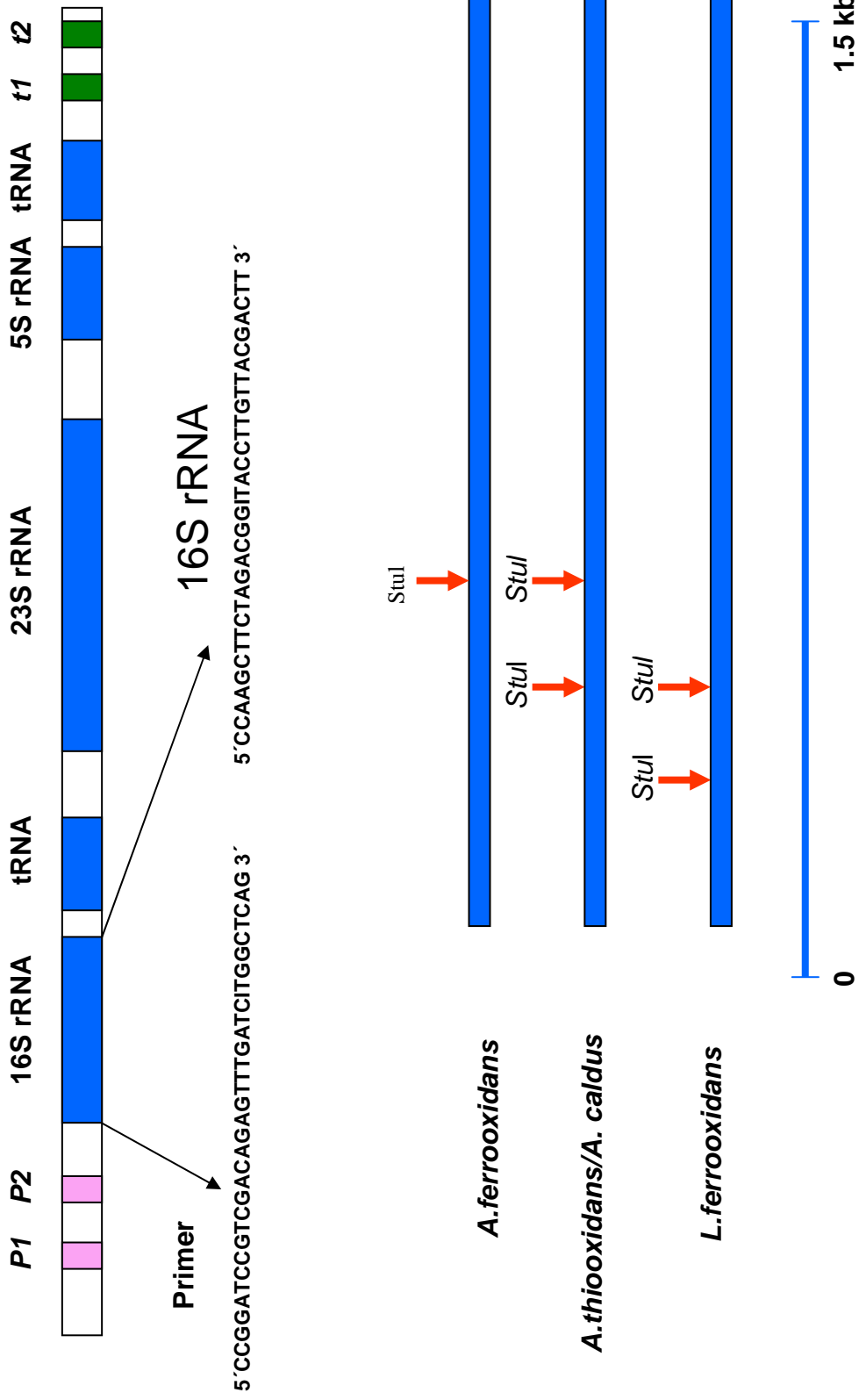


Figura 3. Genotipificación de bacterias biooxidantes por análisis de 16S rRNA